

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**DETECÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE LINFÓCITOS T
(CD3+) E B (CD79+) NO ENCÉFALO DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL E PRESENÇA DE
ANTICORPOS SÉRICOS ANTI-*Toxoplasma gondii* e
ANTI- *Neospora caninum***

Keila Priscilla Sakamoto
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**DETECÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE LINFÓCITOS T
(CD3+) E B (CD79+) NO ENCÉFALO DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL E PRESENÇA DE
ANTICORPOS SÉRICOS ANTI-*Toxoplasma gondii* e
ANTI- *Neospora caninum***

Keila Priscilla Sakamoto

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia – Unesp, Campus de Araçatuba,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal (Fisiopatologia
Médica e Cirúrgica)

Araçatuba – SP
2009

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S158d Sakamoto, Keila Priscilla.
Detecção imunoistoquímica de linfócitos T (CD3+) e B (CD79+) no encéfalo de cães com leishmaniose visceral e presença de anticorpos séricos anti-Toxoplasma gondii e anti-Neospora caninum / Keila Priscilla Sakamoto. – Araçatuba : [s.n.], 2010
79 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2010
Orientadora: Profa. Gisele Fabrino Machado

1. Linfócitos 2. Leishmaniose visceral 3. Toxoplasmose
4. Neospora 5. Encefalite

CDD 636.0896

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KEILA PRISCILLA SAKAMOTO – Nascida na cidade de Araçatuba - SP, em 28 de março de 1981, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Faculdade Educacional de Andradina em janeiro de 2001, concluindo o curso na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) em Presidente Prudente em julho de 2006. Em 2007 fez Residência Médico-Veterinária em Clínica Médica de Pequenos Animais na UNOESTE. Em março de 2008, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, na Área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araçatuba.

Dedico este trabalho...

...aos meus pais, Cláudio e Leila e aos meus irmãos Claudio e Christian pelo amor, pela compreensão e por terem acreditado nos meus ideais, me incentivado e guiado para que eu jamais desistisse.

... ao meu sobrinho Paulinho
Muito querido e amado

... ao meu namorado Vander,
pelo amor, cumplicidade e confiança.

Vocês são fundamentais na minha vida!

Em especial,

À minha querida orientadora Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado pelo incentivo, confiança, carinho e amizade oferecida durante o mestrado. Por todo o esforço realizado para a concretização deste experimento, por inúmeras vezes ter deixado de lado suas coisas para me ajudar e me guiar, por ser um exemplo profissional. À compreensão sempre presente frente aos meus lapsos. Por todos os ensinamentos transmitidos minha eterna gratidão!
Não tenho palavras para agradecer.
Muito obrigada !!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar no meu caminho.

À Pós-graduação do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, *campus* de Araçatuba, pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Mestrado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho

Ao aluno da graduação, Guilherme de Melo, pela ajuda indispensável na execução de todo o projeto, não mediu esforços em me ajudar, deixando de lado seus afazeres. Muito obrigada !!!

À Profa. Dra. Silvia Helena Venturoli Perri pela ajuda essencial na elaboração da análise estatística.

À Profa. Dra. Valéria Marçal Félix de Lima pela realização da sorologia para detecção de anticorpos de *Leishmania chagasi*

À Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, responsável pelo Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV / UNESP, *campus* de Jaboticabal pela realização da sorologia para toxoplasmose e neosporose.

À Profa. Dra. Mary Marcondes e Dra. Luzia Queiroz pelas sugestões no Exame Geral de Qualificação, que muito contribuíram para melhorar a apresentação final deste projeto.

Ào funcionário José Cabrerizo, do setor de Patologia da Unesp, *campus* Araçatuba. pelo o auxílio na coleta do material.

Às funcionárias Maria Inês Yamazaki e a Francisca de Assis Ardisson do Laboratório de Patologia da FCAV / UNESP, *Campus* de Jaboticabal, pelo suporte técnico durante o processamento do material.

Aos meu amigos que sempre me incentivaram a crescer profissionalmente

À minha funcionária Regina, pela paciência e ajuda no período da concretização deste trabalho.

Aos cães que involuntariamente participaram desta e de tantas outras pesquisas.

DETECÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE LINFÓCITOS T (CD3+) E B (CD79+) NO ENCÉFALO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL E PRESENÇA DE ANTICORPOS SÉRICOS ANTI-*Toxoplasma gondii* E ANTI- *Neospora caninum*

RESUMO - A Leishmaniose visceral é uma enfermidade que possui uma grande variabilidade de manifestações clínicas, em humanos como em cães. Cães cronicamente infectados podem desenvolver desordens neurológicas, contudo, há poucos relatos que caracterizam as lesões e elucidam a patogenia da leishmaniose cerebral canina. Considerando a imunossupressão associada à leishmaniose visceral e que os patógenos oportunistas *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* podem colaborar para a ocorrência de lesões no sistema nervoso central de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, as populações de linfócitos B (CD79⁺) e T (CD3⁺) foram avaliadas no tecido nervoso de cães portadores de leishmaniose visceral e que possuem soropositividade para *T. gondii* e *N. caninum*. Lesões inflamatórias, caracterizadas por acúmulos de células mononucleares compostos principalmente por linfócitos T CD3⁺ predominaram em diversas regiões encefálicas dos cães infectados (P = 0,0012). Linfócitos B CD79⁺ foram detectados em pequena intensidade, não havendo diferença entre os grupos (P = 0,3604). Os resultados obtidos sugerem que a co-presença de leishmaniose visceral, toxoplasmose e neosporose é importante para o agravamento das lesões encefálicas, e que a imunossupressão gerada pela infecção por *Leishmania* não somente favorece a infecção por outros patógenos, mas colabora com esses, ocasionando lesões mais severas no tecido nervoso.

Palavras-chaves: linfócitos, leishmaniose visceral, toxoplasmose, neospora, encefalite

**DETECTION IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF T (CD3+) AND B (CD79+)
LYMPHOCYTES IN THE ENCEPHALIC AREAS OF DOGS WITH
LEISHMANIA VISCERAL AND WITH ANTICORPUS ANTI-*Toxoplasma
gondii* AND ANTI- *Neospora caninum***

SUMMARY - Visceral leishmaniasis is a disease with great variability regarding the clinical manifestations, in humans as in dogs. Chronically infected dogs may develop neurological disorders, however, there are few reports that characterise the lesions and make clear the pathogenesis of the canine cerebral leishmaniasis. Considering the immunosuppression associated to visceral leishmaniasis and that the opportunist pathogens *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* may collaborate to the occurrence of lesions in the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*, we evaluated the population of B (CD79+) and T (CD3+) lymphocytes in the nervous tissue of dogs with visceral leishmaniasis and with seropositivity to *T. gondii* and to *N. caninum*. Inflammatory lesions, characterised by mononuclear cells accumulation, composed mainly by CD3+ T lymphocytes predominated in several encephalic regions of the dogs from the infected groups ($P=0.0012$). CD79+ B lymphocytes were detected in very small intensity and presented no difference among groups ($P=0.3604$). The results presented herein suggest that the co-presence of visceral leishmaniasis, toxoplasmosis and neosporosis is important for the worsening of the encephalic lesions, and that the immunosuppression caused by *Leishmania* infection not only propitiates the infection by other pathogens, but collaborate with them, causing more severe lesions in the brain.

Keywords: lymphocytes, visceral leishmaniasis, toxoplasmosis, neospora, encephalitis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	15
2.2 PRINCIPAIS ENCEFALITES CAUSADAS POR PROTOZOÁRIOS EM CÃES.....	19
2.3 INFLAMAÇÃO E RESPOSTA IMUNE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	23
2.4 LINFÓCITOS T (CD3+) E B (CD79+).....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 ANIMAIS.....	35
3.2 DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE ATRAVÉS DO TESTE ELISA E/OU “IMPRINT” DE LINFONODO POPLÍTEO.....	35
3.3 DIAGNÓSTICO DE TOXOPLASMOSE E NEOSPOROSE.....	36
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
3.5 COLETA DE AMOSTRAS DE TECIDO DO ENCÉFALO E FIXAÇÃO DO MATERIAL.....	37
3.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	38
3.7 DETECÇÃO DE LINFÓCTOS NO TECIDO NERVOSO.....	38
3.8 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T E B NO TECIDO NERVOSO.....	39
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 EXAME NECROSCÓPICO E SOROLÓGICO.....	41
4.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	44
4.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....	45
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	59

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Porcentagem de cães submetidos ao diagnóstico sorológico e parasitológico de leishmaniose visceral e da pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em 65 cães provenientes do município de Araçatuba – SP, 2009.

41

Tabela 2. Porcentagem de área imunomarcada para células inflamatórias no encéfalo dos cães com diagnóstico positivo sorológico e parasitológico de leishmaniose visceral e da pesquisa de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em 24 cães (Grupo 1), o Grupo 2 com 31 cães positivos para leishmaniose visceral e o Grupo 3 com 10 cães hígidos com sorologia negativa para leishmaniose visceral, toxoplasmose e neosporose provenientes do município de Araçatuba – SP. Dados apresentados na forma de mediana (intervalo interquartil).

46

LISTA DE FIGURAS

Páginas

Figura 1. Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo de cães naturalmente acometidos por *L. chagasi*, *T. gondii* e/ou *N. caninum* (Grupo 1) **A-** Células inflamatórias em plexo coróide (seta). **B-** Depósito de substância hialina (seta) perivascular no plexo coróide (barra = 50 μ m). Hematoxilina e eosina. ARAÇATUBA- SP, 2009. 47

Figura 2: Fotomicrografias de encéfalo de cão. **A** - Presença de reatividade ependimária em ventrículo lateral caracterizada pela formação de roseta (seta) (Grupo 2). **B-** Infiltrado inflamatório mononuclear discreto em leptomeninge de região cortical (seta/ Grupo 1)(barra = 50 μ m). Hematoxilina e eosina. ARAÇATUBA – SP,2009. 48

Figura 3: Fotomicrografias do encéfalo de cães com leishmaniose visceral. Imunomarcacão de linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD79⁺ **A-** **mostrando** linfócitos T CD3⁺ perivasculars (*) em plexo coróide. **B,** mesmas regiões que A, raras células (setas) são positivas para o anticorpo anti-CD79 α (barra = 50 μ m). Complexo Estreptovidina e biotina peroxidase. ARAÇATUBA – SP, 2009. 49

Figura 4: Fotomicrografias do encéfalo de cães com LV, mostrando os linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD79⁺ (*) **A-** Linfócitos T CD3⁺ compondo principal população celular em infiltrado inflamatório em leptomeninge (*) de região cortical. **B,** nas mesmas regiões que A, raras células (setas) são positivas para o anticorpo anti-CD79 α (barra = 50 μ m). Complexo estreptovidina biotina peroxidase. ARAÇATUBA – SP, 2009. 50

Figura 5: Fotomicrografias do encéfalo de cães com LV, mostrando linfócitos T CD3+ e linfócitos B CD79+ A- Manguito perivascular em região talâmica composto principalmente por células T CD3+ (*).B, nas mesmas regiões que A, raras células (setas) são positivas para o anticorpo anti-CD79 α (barra = 50 μ m). Complexo estreptovidina biotina peroxidase. ARAÇATUBA – SP, 2009.

51

Figura 6. Porcentagem de linfócitos T CD 3+ encontrados no encéfalo de cães com leishmaniose visceral e co-infecção por *T. gondii* e *N. caninum* (Grupo 1), em cães, apenas, com leishmaniose visceral (Grupo 2) e em cães hígidos com sorologia negativa para leishmaniose visceral, toxoplasmose e neosporose (Grupo 3) provenientes do município de Araçatuba – SP, 2008 . Avaliado colorimetricamente pelo *software* Image-Pro Plus 6.1. As linhas horizontais indicam a mediana e o intervalo interquartil (* indica $p < 0,05$).

52

Figura 7. Porcentagem de linfócitos B CD 79+ encontrado no encéfalo de cães com leishmaniose visceral e co-infecção por *T. gondii* e *N. caninum* (Grupo 1), em cães, apenas, com leishmaniose visceral (Grupo 2) e em cães hígidos com sorologia negativa para leishmaniose visceral, toxoplasmose e neosporose (Grupo 3) provenientes da região de Araçatuba – SP, 2008 . Avaliado colorimetricamente pelo *software* Image-Pro Plus 6.1. As linhas horizontais indicam a mediana e o intervalo interquartil

53

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma parasitose de carácter zoonótico, sendo apontada como umas das doenças mais importantes do ponto de vista da saúde pública em cerca de 80 países da Europa, Ásia, África e América, atingindo os cinco continentes.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose afeta cerca de dois milhões de pessoas a cada ano. O Brasil é responsável por 90% dos casos de leishmaniose visceral humana no continente americano. O primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina no estado de São Paulo foi diagnosticado em maio de 1998, em Araçatuba e desde então, o número de casos só vem aumentando.

Até a presente data a leishmaniose visceral canina foi registrada em 57 municípios do Estado de São Paulo, abrangendo todas as regiões em que o vetor foi detectado. Apenas na Região Metropolitana de São Paulo o mecanismo de transmissão ainda não foi totalmente elucidado, afinal não há a presença do vetor.

A infecção causada por *Leishmania chagasi* resulta em doença que apresenta uma grande variação nas manifestações clínicas, tanto em seres humanos como em cães. Estas manifestações variam da observação de cães infectados e assintomáticos à observação de um quadro clínico sistêmico que podem resultar na morte do hospedeiro. Cães infectados cronicamente podem apresentar déficite neurológico, entretanto existem poucos relatos que caracterizam as lesões observadas e elucidam a patogenia da forma nervosa

da leishmaniose visceral. Em seres humanos, a associação de leishmaniose com a Síndrome da imunidade adquirida (SIDA) aumenta a probabilidade de invasão do tecido nervoso, e vem se tornando motivo de preocupação na realização de diagnósticos diferenciais.

As manifestações clínicas da doença variam de acordo com a patogenicidade do parasita, que difere entre as espécies, e com as respostas imunológicas celulares do hospedeiro. Observa-se que a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção está associada à imunidade celular, com participação de linfócitos e macrófagos, e a progressão da doença está relacionada com a produção de imunoglobulinas, que não são efetivas na eliminação do parasita, portanto à imunidade humoral.

A indução preferencial da participação de linfócitos T ou B depende de alguns fatores, como a dose infectante, o mecanismo de apresentação do antígeno, a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro.

Considerando a imunossupressão associada à LV e que infecções oportunistas, tais como a toxoplasmose e/ou neosporose, podem contribuir para a ocorrência de lesões encefálicas em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, teve-se como objetivo avaliar pela técnica de imunohistoquímica, a população de linfócitos T(CD3+) e B (CD79+) no encéfalo dos animais com LV e com sorologia positiva para toxoplasmose e neosporose, na tentativa de elucidar a fisiopatogenia das lesões observadas no sistema nervoso central.

2. Revisão de literatura

2.1 Leishmaniose visceral canina (LVC)

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma antroponose, causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. Nas Américas, é causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, na Ásia e na África pela *Leishmania (Leishmania) donovani* e, ainda, na Ásia, África e Europa pela *Leishmania (Leishmania) infantum* (OMS), observada no cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores. No cão, a infecção por *L. (L.) chagasi* causa frequentemente uma doença sistêmica crônica, clinicamente caracterizada por longos períodos de febre irregular, anemia, perda progressiva de peso e caquexia (FERRER, 1992; GENARO, 1993; NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000).

Os animais acometidos podem ainda apresentar alterações dermatológicas, onicogribose, comprometimento da função renal, distúrbios hepáticos, pneumonia, miocardite, problemas locomotores, diáteses hemorrágicas e alterações oculares (CIARAMELLA et al., 1997; MORENO et al., 1998; SLAPPENDEL; FERRER, 1998; NOLI, 1999).

A leishmaniose visceral canina pode ser considerada como uma doença imunomediada, porque o parasita tem a capacidade de alterar o sistema imunológico do hospedeiro. Durante a doença, as células do sistema fagocítico mononuclear, infectadas por parasitas, podem atuar como células apresentadoras de antígenos, estimulando linfócitos T auxiliares (CD4+) do tipo

1 e 2 (Ta1 ou Ta2, respectivamente). Quando ativados os linfócitos Ta1 produzem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TFN), interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (IFN- γ), um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos. Esses radicais livres são tóxicos para os parasitas (BARBIÉRIE, 2006; MICHALICK; GENARO, 2007; MARCONDES, 2008). Os macrófagos ativados, por sua vez, estimulam a imunidade celular pela estimulação de outras células ou por sua proliferação.

Quando predomina a ativação de linfócitos Ta2, ocorre produção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10), com subsequente proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos, principalmente IgG. A IL-10 é considerada como um regulador da atividade de Ta1, que mantém o equilíbrio entre Ta1 e Ta2 e inibe a atividade dos macrófagos infectados (BARBIÉRI, 2006; DAY, 2007). A atividade exagerada de linfócitos B resulta na produção de imunocomplexos que se depositam nas paredes de vasos sanguíneos e, a deposição destes imunocomplexos tem sido considerada por alguns autores como mecanismo patogênico envolvido nas lesões causadas pela *Leishmania chagasi* em diferentes órgãos (LOPEZ et al., 1996; NOLI, 1999), podendo levar a dermatite, vasculite, glomerulonefrite, uveíte e poliartrite.

Quando predomina a resposta do tipo Ta2, ocorre ativação de linfócitos B e produção de anticorpos. A produção de anticorpos também possui características distintas; em animais assintomáticos e com baixo parasitismo há o aumento de imunoglobulinas do tipo IgG1, enquanto animais sintomáticos e com alto parasitismo estão relacionados com elevação das imunoglobulinas dos tipos IgG2, IgM, IgA e IgE (BARBIÉRI, 2006; REIS et al., 2008). Níveis

elevados de anticorpos anti-leishmania foram descritos no líquido de animais infectados.

A resposta Ta1 está associada à capacidade do hospedeiro em controlar a infecção, e a resposta Ta2 está correlacionada com a progressão da doença. A indução preferencial de linfócitos Ta1 ou Ta2 depende de alguns fatores, como a dose infectante, o mecanismo de apresentação do antígeno, a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro (FERRER, 2002; CIARAMELLA; CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006; MICHALICK; GENARO, 2007; MARCONDES, 2008).

A leishmaniose visceral é caracterizada por promover hiperplasia de células do sistema fagocítico mononuclear, mais precisamente no baço, fígado e medula óssea, onde os parasitas se multiplicam (CORBERTT; LAURENTI, 1998).

As alterações histopatológicas dos órgãos encontrados na LVC são similares às descritas na doença humana (KEENAM et al., 1984), embora a lesões cutâneas no cães sejam mais intensas e estejam presentes com maior frequência (LARANJEIRA, 2008).

Os órgãos linfóides são alvos da doença. Os linfonodos geralmente são encontrados hipertrofiados, com perilinfoadenite, hipertrofia dos cordões e dos folículos, intensa fibrose, seios dilatados e hiperplasia de macrófagos. População reduzida de linfócitos e proliferação de macrófagos nas áreas paracorticais e cordões medulares (GIUNCHETTI, 2008). Hiperplasia folicular e plasmocitose intensa foram também observadas (KEENAM et al., 1984; CORBERTT et al. 1992).

No baço geralmente encontra-se diminuição de linfócitos na bainha linfóide periarteriolar e proliferação de macrófagos nessa região; hiperplasia folicular e aumento da polpa vermelha com agregados de macrófagos e plasmócitos (KEENAM et al., 1984; XAVIER et al., 2006).

O fígado frequentemente encontra-se aumentado de volume, apresentando um infiltrado linfo-plasmocitário e hiperplasia das células de Küpffer (KEENAM et al., 1984). Pode ocorrer uma hepatite difusa acompanhada de reação inflamatória exsudativa com infiltrado linfo-plasmocitário nos espaços portais (XAVIER et al., 2006).

Na medula óssea há maior celularidade, decorrente da proliferação de macrófagos que podem ou não conter parasitas (KEENAM et al., 1984). A multiplicação do parasita, neste local, pode levar a hipoplasia medular.

Na literatura há alguns trabalhos que descrevem as alterações histopatológicas do encéfalo de cães com LV. Nestes trabalhos há descrição também de alterações degenerativas (neurônios isquêmicos, satelitose e neuronofagia), mas descrever alterações degenerativas não foi o objetivo primordial deste trabalho. Assim, Garcia-Alonso et al. (1996) observaram em 27 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, coroidite caracterizada por hiper celularidade, edema perivascular, infiltrado de células inflamatórias, trombose, metaplasia epitelial e depósito de substância amilóide nos capilares do plexo coróide. Ainda neste trabalho os autores descrevem degeneração Walleriana das células de Purkinje satelitose, neuronofagia, intensa mobilização da micróglia e degeneração neuronal, concordando com os relatos de Nieto et al. (2006).

2.2 Principais Encefalites Causadas por Protozoários em Cães

O comprometimento do sistema imunológico devido à infecção por *Leishmania chagasi* pode se relacionar com a infecção por outros agentes. Diversos estudos apontam uma associação entre leishmaniose e neosporose (TARANTINO et al., 2001; CRINGOLI et al., 2002; GENNARI et al., 2006). A toxoplasmose também é uma enfermidade oportunista e relacionada com doenças imunossupressivas (MORETTI et al., 2002; WEBB et al., 2005; GENNARI et al., 2006; BRESCIANI et al., 2008).

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário coccídio, parasita intracelular obrigatório, com ciclo biológico complexo e que acomete praticamente todas as espécies animais de sangue quente, inclusive o homem (DUBEY; BEATTIE, 1988).

No seu ciclo, o *T. gondii* se apresenta sob duas formas evolutivas: os taquizoítos, estruturas de rápida multiplicação e que ocorrem na infecção aguda, e os bradizoítos, confinados em cistos teciduais e presentes na infecção crônica. Já, os oocistos, são o produto final da reprodução sexuada, formados somente no trato digestivo dos felídeos, seus hospedeiros definitivos (MILLER et al., 1972), que os eliminam juntamente com as fezes onde, por meio da esporogonia, tornam-se infectantes, sendo extremamente resistentes às condições ambientais, de acordo com Ylmaz e Hopkins (1972). Estas formas evolutivas estão disseminadas, principalmente, em áreas freqüentadas por gatos (RUIZ et al., 1973). Além da ingestão de oocistos através de alimentos ou água contaminadas, ainda podem ser transmitidos por infecção congênita e ingestão dos tecidos infectados (GREENE, 2006)

Devido ao elevado índice de animais naturalmente infectados por *T. gondii*, agente reconhecidamente oportunista, e sua correlação com doenças imunossupressivas, como a cinomose (MORETTI et al., 2002), deve-se atentar para a ocorrência desta enfermidade na espécie canina. O cão, apesar de não ser hospedeiro definitivo, contribui na disseminação mecânica desta protozoonose (FRENKEL; PARKER, 1996; LINDSAY et al., 1997, SCHARES et al., 2005; Bresciani et al., 2008).

Os principais sintomas observados na toxoplasmose são infecção respiratória, gastrintestinal ou neuromuscular que resulta em febre, dispnéia, êmese, diarréia e dispnéia e icterícia ocorre mais comumente em caninos com infecção generalizada. Os sinais neurológicos dependem da localização primária no cérebro, cerebelo, tronco encefálico, medula espinhal e incluem ataxia, tremor de intenção, déficit dos nervos cranianos, paresia e paralisia. Os cães com miosite apresentam fraqueza e andar rígido. Pode ocorrer rápida progressão para tetraparesia e paralisia do neurônio motor inferior (OPPERMAN, 1971; AVERRIL; LAHUNTA, 1971; SHARMA et al, 1973; NEBIST et al, 1981; SUTER et al., 1984; ABREU et al, 2001; NELSON; COUTO, 2006).

A encefalite causada por *T. gondii* é bem caracterizada e o papel de linfócitos T CD4+ e CD8+ já foram relatados (SUZUKI & REMINGTON, 1988; ARAÚJO, 1991). Deckert et al. (2006) descrevem atividade microglial em resposta à encefalite murina causada por *Toxoplasma sp*, aliada à expressão aumentada de MHC-II, TNF, iNOS e à secreção de interleucinas por neurônios.

O protozoário *Neospora caninum* é um importante parasito intracelular, de ocorrência mundial, incriminado por causar abortos e alterações no sistema nervoso central, podendo levar à morte (GENNARI et al, 2006). Os cães e os coiotes são considerados os hospedeiros definitivos, por isso têm grande importância epidemiológica nessa doença. O ciclo sexual é completado no trato gastrointestinal dos caninos. Os esporozoítos desenvolvem-se em oocistos no intervalo de 24 horas após a eliminação pelas fezes. Os taquizoítos (estágio de rápida divisão) e cistos teciduais, contendo milhares de bradizoítos (estágio de divisão lenta), são os outros dois estágios de vida. Os caninos são infectados através da ingestão de bradizoítos. Os cães adultos podem apresentar envolvimento multifocal do SNC, tremores de intenção, ataxia, head tilt, cegueira, anisocoria e convulsões, pode-se ter ainda paralisia de evolução rápida (GREENE, 2006; NELSON; COUTO, 2006).

A infecção do SNC resulta na presença de infiltrado celular mononuclear, o que sugere um componente imunomediado na patogênese da doença. Cistos teciduais intactos, em estruturas neurais, geralmente não estão associados à inflamação, mas cistos teciduais rompidos induzem à inflamação (NELSON; COUTO, 2006).

No Brasil, a detecção de anticorpos anti *N. caninum* em soros de cães com ou sem sintomas neurológicos foi relatada por diversos autores, com prevalências variando entre 14,77% e 35,57% (BELO et al., 1999, REZENDE et al., 1999; VARANDAS et al., 2001).

Dubey *et al.* (1998) ao estudarem as lesões histopatológicas em camundongos experimentalmente infectados por *N. caninum*, descreveram

uma miosite em musculatura cardíaca e esquelética e uma encefalite, composta por nódulos gliais, áreas multifocais de malácia, manguitos perivasculares e infiltrado mononuclear no parênquima nervoso. Relataram ainda, a presença de cistos e grupos de taquizoítos no tecido nervoso, com ou sem reação tecidual.

A incidência concomitante de Leishmaniose, Toxoplasmose e Neosporose na região de Araçatuba já foi analisada por Gennari *et al.* (2006), os quais detectaram uma associação entre as três doenças em 17 cães. Além disso observaram que, dos 98 cães que apresentaram sorologia positiva para *Leishmania chagasi*, 15 também apresentaram sorologia positiva para *N. caninum* e 23 para *T. gondii*, concordando com Tarantino *et al.* (2001), que apontaram a imunossupressão causada pela *Leishmania* sp como a causa da maior prevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*.

Gennari *et al.* (2006) não detectaram associação, na sorologia, entre toxoplasmose e leishmaniose. Observaram associação entre a presença de anticorpos anti-*L. chagasi* e a presença de anticorpos anti-*N. caninum* ($p < 0,01$).

Outros protozoários podem infectar o SNC de cães, porém com menor frequência, estando descritos em casos isolados na literatura. A *Babesia canis*, protozoários, transmitido por carrapatos e que parasitam hemácias de cães, pode levar a uma anemia progressiva e, em casos crônicos pode levar a alterações neurológicas, como, incoordenação, tetraparesia, tremores musculares, nistagmo, anisocoria, vocalização, estupor e coma (GREENE, 2006; NELSON; COUTO, 2006).

A hepatozoonose é causada pelo protozoário *Hepatozoon canis*, geralmente está associada à imunossupressão do hospedeiro, os cães,

geralmente, apresentam anemia, perda de peso, febre e hiperglobulinemia (GREENE, 2006; NELSON; COUTO, 2006).

O *Trypanossoma cruzi* é um flagelado que infecta muitos mamíferos, causando a doença de Chagas, enfermidade que pode levar a linfadenopatia generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia alterações cardíacas e, esporadicamente, sinais neurológicos, como meningoencefalite, incluindo ataxia de membros pélvicos (GREENE, 2006; NELSON; COUTO, 2006). Sendo o maior problema de saúde pública na América do Sul, especialmente no Brasil, Venezuela e Argentina.

A microsporidiose em cães e gatos é causada por um parasita intracelular denominado *Encephalitozoon cuniculi*. Os animais podem se infectar por contato direto ou inalação de esporos presentes em urinas contaminadas. Pode ocorrer insuficiência renal e alterações neurológicas, como depressão, ataxia, convulsões e cegueira (Greene, 2006).

2.3 Inflamação e Resposta Imune no Sistema Nervoso Central (SNC)

A inflamação pode ser definida como uma resposta do hospedeiro a uma injúria, isquemia tecidual, resposta autoimune ou a agentes infecciosos. Localmente, em outros tecidos que não o nervoso, a inflamação manifesta-se de maneira clássica, com o aparecimento de edema, rubor, calor e com freqüência dor. Mais especificamente, ocorrem mecanismos que resultam na ativação de mediadores químicos como cininas e produtos do metabolismo do

ácido aracdônico, entre outros. Além disso, ocorre a invasão dos tecidos por células inflamatórias, incluindo polimorfonucleares e mononucleares (macrófagos e linfócitos), que modulam a resposta imune (LUCAS et al., 2006).

O SNC, até a alguns anos atrás, era considerado, em condições normais, um local imunologicamente privilegiado, devido ao baixo número de antígenos de histocompatibilidade, ao baixo número de células apresentadoras de antígeno e à eficiência da barreira hematoencefálica (BHE). Esta barreira é composta primariamente por uma camada de células endoteliais, com junções intercelulares do tipo “tight junctions”. Estas são responsáveis pela severa restrição da difusão de íons e outros solutos por entre as células endoteliais, o que efetivamente bloqueia a passagem de macromoléculas por esta via. Os pericitos se encontram distribuídos de maneira descontínua ao longo dos capilares cerebrais, junto com as células endoteliais, estão envolvidos por uma membrana basal, macrófagos perivasculares e pés terminais de astrócitos (BALLABH et al., 2004, STAMATOVIC et al., 2008, ABBOT, et al., 2009).

Muitas vias têm sido propostas para justificar a entrada de patógenos no SNC, o que inclui a invasão direta das células epiteliais do plexo coróide (STRAZIELLE; GHERSI-EGEA, 2000) ou do endotélio capilar, a passagem por entre as células da barreira hematoencefálica ou hematoliquórica, e o transporte através da barreira no interior de leucócitos infectados (HUANG; JONG, 2001; LOSSINSKY; SHIVERS, 2004).

Apesar da existência de barreiras que promovem certo isolamento do tecido nervoso, alguns patógenos como *Echerichia coli*, *Streptococcus* (grupo B), *Cryptococcus neoformans* e *Borrelia burgdorfei* são capazes de cruzar a barreira hematoencefálica e causar lesão neurológica (KIM, 2002; DORAN et

al., 2005; CHARLIER et al., 2005; GRAB et al., 2005). Alguns microorganismos parecem estar adaptados a induzir rupturas na BHE, tendo como alvo principal as “tight junctions” entre as células endoteliais. Assim, a *Chlamydia pneumonia* reduz a expressão de ocludina, enquanto induz a um aumento das moléculas de adesão nas células endoteliais (MACINTYRE et al., 2003). Quando ativadas após exposição a um patógeno, as células endoteliais que compõe a BHE são um importante meio de iniciação da cascata da resposta inflamatória (HIPPENSTIEL; SUTTORP, 2003). Estudos comprovam que o *Plasmodium falciparum* produz fatores solúveis que ativam a BHE (TRIPATHI et al., 2006; TRIPATHI et al., 2007). Já, o *Trypanosoma brucei gambiense*, parece depender da ativação de cisteína proteases Ca^{+2} dependentes, através de mecanismos dependentes da ativação pelo IFN- γ (GRAB; KENNEDY, 2008).

A BHE limita o tráfego de leucócitos para dentro do SNC (BARKER; BILLINGHAN, 1997). Estudos preliminares indicam que apenas células T ativadas são capazes de cruzar a BHE e realizar a vigilância imunológica do SNC (HICKEY, 1991; WILLIAMS; HICKEY, 1995; WELLER, 1996). Posteriormente, demonstrou-se que muitas células T ativadas são destruídas por mecanismos de apoptose quando não encontram nenhum antígeno específico no SNC (BAUER et al., 1998).

A BHE é altamente susceptível à ação de citocinas (Banks et al., 2005) que podem ativar diretamente as células endoteliais aumentando a sua permeabilidade (ROITT et al., 2004). A resposta imune anti-Leishmania inclui a produção de várias citocinas (BANETH et al., 2008) que podem ativar as células endoteliais, alterando a sua permeabilidade, e permitindo a passagem de mediadores inflamatórios e imunoglobulinas. Alterações na BHE podem

permitir a passagem de anticorpos anti-antígenos presentes no tecido nervoso, que normalmente não teriam acesso (DIAMOND et al., 2009). Células como linfócitos, macrófagos e mastócitos, micróglia, astrócitos, oligodendrócitos e neurônios possuem receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (domínio constante). A ativação destes receptores (FcRs) inicia uma série de respostas biológicas que incluem fagocitose, desgranulação, ativação de genes para produção de citocinas que desencadeiam a cascata inflamatória (NIMMERJANH; RAVETECH, 2008; Okun et al, 2009). Portanto, apenas a presença de anticorpos circulantes no tecido nervoso podem contribuir para o desencadeamento do processo inflamatório, como tem sido reportado em doenças imunes (SEIWA et al., 2007) e degenerativas do SNC (DEANE et al.,2009).

A resposta imune efetiva contra a *Leishmania* depende da ativação da resposta celular e da fagocitose realizada por macrófagos. No tecido nervoso, o macrófago tecidual é a micróglia, que pode ser ativada mesmo na ausência do parasita, através de citocinas produzidas pelos linfócitos que infiltram o tecido, ou que são produzidas sistemicamente (PANARO et al., 2009) e podem ultrapassar as barreiras encefálicas.

A inflamação induzida por patógenos no plexo coróide tem se mostrado um fato comum. Bactérias, parasitas e vírus, como a *Neisseria meningitidis*, o *Trypanossoma brucei*, o do sarampo e provavelmente o vírus da AIDS (HIV-1) e o da leucemia (HTLV-1), possuem tropismo para esta região (LEVINE, 1987; STRAZIELLE; GHERSI-EGEA, 2000).

Embora existam muitos relatos sobre lesões sistêmicas na leishmaniose visceral, poucos autores citam a ocorrência de lesões no SNC.

Há relatos sobre a migração de parasitas, deposição de antígenos e imunoglobulinas levando à meningite e à coroidite (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001). Recentemente, em camundongos inoculados experimentalmente com *L. (L.) amazonensis*, espécie conhecida por causar leishmaniose tegumentar, foram detectadas lesões inflamatórias no SNC (ABREU-SILVA et al., 2003).

De 215 cães avaliados clinicamente em Araçatuba, de janeiro a novembro de 1999, 4% apresentaram alterações neurológicas caracterizadas por paraparesia, evoluindo para paraplegia (FEITOSA et al., 2000). A análise histopatológica do SNC de cães com LV evidenciou a presença de alterações como coroidite, depósitos hialinos na parede de vasos, e leptomeningite, inclusive em animais que não apresentavam déficit neurológico evidenciado pelo exame clínico (IKEDA et al., 2007).

Em relação aos sintomas nervosos, Ikeda et al., (2007) observaram, que todos os sinais neurológicos são compatíveis com as lesões observadas no exame histopatológico, contudo não há correlação entre a intensidade das lesões e a severidade dos sintomas clínicos.

Não existem mais dúvidas de que os linfócitos T podem penetrar no SNC, realizando a “vigilância imunológica” e buscando por antígenos estranhos (HICKEY et al., 1999). Tem sido demonstrado também, que linfócitos infundidos nos ventrículos podem ser encontrados em linfonodos regionais, onde entram em contato com células dendríticas, apresentadoras de antígenos (SEABROK et al., 1998), caracterizando uma recirculação normal destas células. Piedemonte et al.(2006) relatam que células T encontradas no liquor co-expressam os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR3, o que confirma o

recrutamento preferencial de células Ta1 durante reações inflamatórias no SNC, além de sugerir a utilização de quimiocinas na mediação da migração celular, em situações normais ou inflamatórias.

O papel dos linfócitos B na resposta imune que ocorre no SNC durante a inflamação tem sido claramente demonstrado pela freqüente detecção de imunoglobulina intratecal (THOMPSON; KEIR, 1990). Entretanto, a função destas células na vigilância imune fisiológica é menos compreendida quando comparada com a função das células T. Konopf et al. (1998) demonstraram que, aparentemente, as células B podem mimetizar a função dos linfócitos T, reconhecendo antígenos específicos e produzindo Ig-G oligoclonal. As células B de memória, com fenótipo CD9+, são o principal sub-tipo encontrado no líquido em condições inflamatórias como a esclerose múltipla. Segundo os autores, estas células também expressam CD80 e CD86, o que as coloca na provável função de apresentadoras de antígenos (CORCIONE et al., 2004).

Estímulos inflamatórios ou infecciosos incitam uma resposta bem diferente no tecido nervoso, onde é bastante evidente o atraso no recrutamento das células inflamatórias. Entretanto, em resposta a insultos agudos no tecido, ocorre ativação muito rápida da micróglia, uma marca registrada da inflamação no SNC, que produz e libera mediadores inflamatórios, como citocinas, óxido nítrico, prostaglandinas e radicais livres, que contribuem para a morte neuronal. Existem evidências de que a inflamação no SNC contribui para muitas doenças degenerativas, agudas e crônicas, que podem causar seqüelas neurológicas (LUCAS et al., 2006). Bruzzone et al. (2009) citaram alguns exemplos de doenças infecciosas que podem causar déficits neurológicos em seres humanos, tais como perda da função motora e sensitiva na malária e

encefalites virais, alterações de comportamento e cognição na AIDS, ou perturbações no sono em casos de tripanossomíase africana.

Quando ocorre um processo inflamatório, os componentes da barreira hematoencefálica participam deste processo, produzindo ou expressando uma variedade de citocinas, moléculas de adesão, serina proteases, produtos derivados do ácido aracdônico, óxido nítrico e metaloproteinases (WEBB & MUIR, 2000). Leucócitos também expressam metaloproteinases de matriz (MMPs) para facilitar sua entrada no SNC (LEPPERT et al., 1995; ROSEMBERG, 2002), o que resulta em ruptura da membrana basal subendotelial e promove a quebra das barreiras cerebrais.

As células da glia, astrócitos e micróglia podem, por si mesmas, iniciar, regular e sustentar a resposta inflamatória no SNC (BERCHER et al., 2000).

Insultos ao SNC podem ser rapidamente reconhecidos pela micróglia que, em resposta, inicia um processo inflamatório, com a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6, que podem permeabilizar a BHE, quimiocinas e radicais livres, além de aumentar a taxa de fagocitose (RANSOHOFF; PERRY, 2009, TAMBUYZER et al., 2009). A ativação crônica da micróglia pode resultar em dano neuronal devido à liberação de moléculas potencialmente citotóxicas, como citocinas pró-inflamatórias, radicais livres do oxigênio, proteinases e proteínas do sistema complemento (DHENN et al., 2007).

A ativação da micróglia em algumas situações pode estar associada à produção de mediadores anti-inflamatórios (PERRY et al., 2004). A resposta imune inata no encéfalo é bastante heterogênea no que diz respeito à ativação da micróglia. Como outros macrófagos, estas células participam nos processos

de reparo e resolução após infecção ou injúria, restaurando a homeostasia normal do tecido (COLTON et al., 2009).

Embora a literatura reforce bastante os efeitos deletérios da inflamação no SNC (FARINA et al., 2007), sabe-se que ela também pode trazer alguns benefícios. Em resposta a lesões, os astrócitos se tornam ativados, aumentam a sua expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), e produzem citocinas e fatores de proliferação celular (SOFRONIEW et al., 2009). Em contraste com outras células do tecido nervoso, os astrócitos são resistentes à apoptose desencadeada pelo receptor Fas (SONG et al., 2006), o que faz esta célula estar muito bem equipada para resistir aos insultos inflamatórios. De fato, os astrócitos podem tanto contribuir para promover a resposta inflamatória através da ativação de vias NF-kappa B dependentes, como podem proliferar e isolar a lesão, restabelecendo a homeostasia (FARINA et al., 2007).

Considerando que existem similaridades nos processos fisiológicos e patológicos que modulam a resposta imune no tecido nervoso em outros tecidos, o SNC deve ser considerado um local *imunologicamente especializado*, onde a interação entre células imunocompetentes e células nervosas ainda precisa ser mais bem compreendida (PEDEMONTE et al., 2006). As interações que ocorrem entre as células endoteliais, astrócitos e micróglia formam um complexo sistema dentro do SNC, que regulam a permeabilidade da BHE (HUDSON et al., 2005)

A principal via de entrada de leucócitos no SNC requer a abertura da BHE e passagem pela membrana basal. Em geral, a entrada de células inflamatórias em tecidos alvo depende do estado de ativação destas células, da

expressão de moléculas de adesão, e da coordenação realizada pelas quimiocinas (MOSER; LOESTSCHER, 2001)

No encéfalo, as principais portas de entrada para patógenos são as as regiões circunventriculares (ENGELHARDT; RANSOHOFF, 2005), especialmente representados pelo plexo coróide, devido à presença de junções intercelulares do tipo “gap junctions” no endotélio e fenestrações nos capilares dessas regiões, além das meninges (CARRITHERS et al., 2000; KIVISÄKK et al., 2003; PETITO & ADKINS, 2005). Quando ocorre um processo inflamatório, os componentes da barreira hematoencefálica participam deste processo, produzindo ou expressando uma variedade de citocinas, moléculas de adesão, serina proteases, produtos derivados do ácido aracdônico, óxido nítrico e metaloproteinases (WEBB; MUIR, 2000). Leucócitos também expressam metaloproteinases de matriz (MMPs) para facilitar sua entrada no SNC (LEPPERT et al., 1995; ROSEMBERG, 2002), isso resulta em ruptura da membrana basal subendotelial e promove a quebra das barreiras cerebrais.

2.4 Linfócitos T e B

Os linfócitos expressam um grande número de imunomarcadores em suas membranas, os quais podem ser utilizados para distinguir várias subpopulações celulares. O sistema CD (*cluster of differentiation*) refere-se a grupos ou agrupamentos de anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a um determinado marcador celular (ROITT et al.,1993). O CD3+ é uma importante molécula do complexo receptor antigênico (TCR) presente na membrana de linfócitos T, que transmite sinais à célula quando o

receptor TCR se conjuga com o antígeno (ROITT et al.,1993). As moléculas CD3+ encontram-se presentes em todos os subtipos de linfócitos T (ROITT et al.,1993). Os linfócitos T CD3+ podem ser de fenótipo CD4+(auxiliar ou *helper*) ou CD8+ (citotóxico). A LV é considerada uma enfermidade imunomediada e o quadro clínico tem sido relacionado com a resposta imune celular envolvendo linfócitos T (Machado *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2008).

O receptor de linfócitos B consiste de imunoglobulinas de superfície ligadas a moléculas, como o CD79+. No entanto, a expressão de superfície para receptores de IgG ou do complemento também podem auxiliar na identificação destas células (ROITT; DELVES, 2004). Desta forma, a detecção de algumas moléculas em tecidos de animais infectados permite determinar se a resposta imunológica desenvolvida pelo cão é do tipo celular (CD 3+) ou humoral (CD 79+) (TORRES-NETO et al., 2008; GOMES, 2009).

Laranjeira (2008) avaliando por meio de imunoistoquímica a presença de CD3+ no baço, linfonodos e biópsias de pele de 120 cães com leishmaniose visceral infectados naturalmente na região de Araçatuba – SP, observou a presença de marcação de células anti-CD3+ em 100% dos baços e linfonodos estudados, variando a intensidade de discreta a intensa e em 39% na pele, houve associação direta entre baixa expressão e alto parasitismo na pele.

Gomes (2009) observou a presença de linfócitos T (CD3+) em todos os músculos parasitados, sendo eles, tríceps braquial, extensor carpo radial, bíceps femoral e gastrocnêmio dos 23 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. As células marcadas concentravam-se em áreas com

infiltrado inflamatório mononuclear e/ou com presença de degeneração e necrose de miofibras, com distribuição focal e multifocal, na região endomisial.

Marcondes (2008) ao estudar cães oligossintomáticos e sintomáticos não correlacionou a presença de manifestações neurológicas nos cães com a intensidade das lesões e com a severidade do quadro clínico. Refere que os sintomas de comprometimento do SNC associados à leishmaniose visceral, numa fase mais avançada da doença, possivelmente são decorrentes de uma reação do sistema imune e não da presença do parasita no tecido nervoso. Em um estudo realizado previamente observou-se que a presença ou não de sinais clínicos da LV, exceto sintomas os neurológicos, não interferiram nas alterações histopatológicas encontradas no encéfalo dos cães naturalmente infectados, ou seja, não houve diferença significativa entre às alterações morfológicas observadas no encéfalo de cães assintomáticos ou sintomáticos para LV (MELO et al., 2009).

Melo et al (2009), ao estudarem as lesões histopatológicas de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp*, descreveram a ocorrência de um infiltrado inflamatório intenso (linfócitos, macrófagos, células do plasma e alguns neutrófilos) no plexo coróide, parênquima e leptomeninges e, por meio de imunohistoquímica, verificaram um maior número de linfócitos T (CD 3+) em relação ao linfócitos B (CD 79+).

Como a leishmaniose visceral se caracteriza pela estimulação crônica do sistema imunológico, com envolvimento de células T ativadas, é possível supor que a permeabilidade da barreira hematoencefálica esteja facilitada para a entrada das mesmas no SNC dos animais, como foi observado por Melo et al. (2009). A co-infecção dos cães pode ser um fator importante para desencadear

a ativação de linfócitos, que podem atravessar a BHE e que contribuir para o surgimento das lesões no sistema nervoso dos cães com leishmaniose.

Baseando-se no fato de que a ocorrência de co-infecções por *Toxoplasma gondii* e/ou *Neospora caninum* pode influenciar na migração celular de linfócitos T e B, e na resposta inflamatória no SNC de cães naturalmente acometidos por LV, o presente estudo teve como objetivos comparar as lesões neurológicas e a quantidade de linfócitos T e B no encéfalo de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com a quantidade linfócitos T e B e as lesões observadas em cães com LV que possuíam também anticorpos séricos anti-*Toxoplasma gondii* e/ou *Neospora caninum*.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 55 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral provenientes do atendimento realizado no Hospital Veterinário da UNESP-FOA, *campus* de Araçatuba e do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de Araçatuba-SP, submetidos à eutanásia em cumprimento ao Decreto nº 51.383 do Ministério da Saúde do Brasil.

Além desses animais, foram utilizados 10 animais provenientes do atendimento realizado no Hospital Veterinário da UNESP – FOA, *campus* de Araçatuba-SP com histórico de traumatismos, neoplasias. A morte desses cães não estava relacionada ao comprometimento do SNC.

Os cães eram machos ou fêmeas, sem predileção por idade, raça ou sexo.

3.2. Diagnóstico de Leishmaniose através do teste ELISA e/ou pesquisa parasitária por citologia do linfonodo poplíteo

O diagnóstico da doença foi confirmado por sorologia pela técnica de Elisa indireto, segundo Lima et al., (2003), nos cães com densidade óptica (DO) superior a 0,270. Os cães também foram avaliados quanto à presença de

formas amastigotas de *Leishmania* sp em exame citológico de linfonodos poplíteos por meio de citologia aspirativa por agulha fina.

3.3. Diagnóstico de Toxoplasmose e Neosporose

A pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Nesopora caninum* foi realizada por imunofluorescência indireta segundo Varandas et al (2001), com ponto de corte da reação superior ou igual 1:18 e 1:50, respectivamente.

3.4. Delineamento Experimental

O Grupo 1 foi constituído por 24 cães com leishmaniose visceral com ou sem evidências clínicas da doença e que possuíam sorologia positiva para toxoplasmose e/ou neosporose. O grupo 2 foi composto por 31 animais com diagnóstico positivo somente para leishmaniose visceral. Já o Grupo 3, controle, foi constituído por 10 animais com diagnóstico sorológico negativo para leishmaniose visceral, toxoplasmose e neosporose. O protocolo do projeto foi aprovado pela CEEA – Comissão de Ética e Experimentação Animal – UNESP.

3.5. Colheita de amostras de tecido do encéfalo e fixação do material

Os cães do grupo 1 e 2 foram submetidos à eutanásia segundo a Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho de Ética e Experimentação Animal, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico¹ (15 mg/kg/iv), seguido da administração de uma ampola de cloreto de potássio² 19,1%, por via intravenosa. Antes da administração de cloreto de potássio colheu-se uma amostra de liquor por meio de punção na cisterna magna para estudos posteriores.

Os encéfalos foram colhidos durante exame necroscópico realizado logo após a verificação da morte do animal. Foram fixados em formalina 10% tamponada para posterior inclusão em parafina. Após o tempo de manutenção no fixador (máximo 12 horas), foram obtidos cortes coronais de regiões corticais (temporal e piriforme), hipocampo e diencéfalo, tomando-se o cuidado especial para obter os plexos coróides dos ventrículos laterais.

As amostras das diferentes áreas do encéfalo foram processadas até a inclusão em parafina, cortados a 5 µm e coradas por hematoxilina e eosina para a análise das alterações morfológicas do cérebro.

¹ Hypnol 3% - Fontoveter- Itapira, SP

² Cloreto de Potássio a 19,1% - Darrow – Rio de Janeiro, RJ

3.6. Análise histopatológica

Os cortes histológicos obtidos foram avaliados quanto à presença de células inflamatórias (neutrófilos, plasmócitos, linfócitos, macrófagos), especialmente em região de leptomeninges do córtex, plexo coróide e região endimária e sub-endimária, com especial interesse na observação da presença de células inflamatórias na parede vascular e regiões perivascularares, ventriculares e sub-meníngeas. A leitura das lâminas foi feita sem o conhecimento do grupo experimental do animal.

3.7. Detecção de linfócitos no tecido nervoso

Para a detecção de linfócitos T e B no SNC foi utilizada a técnica imunistoquímica da estreptoavidina-biotina peroxidase. Para linfócitos T utilizou-se o anticorpo policlonal de coelho anti-CD3 humano¹, e para linfócitos B, o anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD79 α humano².

Cortes histológicos de 5 μ m de espessura foram desparafinados em xilol e hidratados em banhos consecutivos em xilol e etanol, em seqüência decrescente de concentração. Foi realizada a recuperação antigênica em panela a vapor com tampão Tris-EDTA, pH 9,0, com Tween-20 a 0,05% (v/v) durante 30 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio 2% (v/v) em álcool metílico 50°GL por 30 minutos. Utilizando-se tampão fosfato (PBS) pH 7,2 acrescido de 3% (p/v) de leite em pó

¹ A0452 – Dako North America, Inc.- Via Real, CA

² M7051 – Dako North America, Inc. – Via Real, CA

desnatado por 30 minutos, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários, em concentração previamente padronizados (CD3 1:100; CD79 1:50) em câmara úmida a 4°C por toda a noite (18 a 22 horas) . Na sequência, foi adicionado o anticorpo secundário biotilado universal (anti-IgG de coelho, de camundongo e de cabra) pronto para uso¹ durante 45 minutos e em seguida o complexo streptoavidina-peroxidase² pronto para uso, por 45 minutos. Entre todas as passagens foram efetuadas três lavagens com PBS pH 7,2 durante 5 minutos cada. A reação foi revelada usando-se como cromógeno o diaminobenzidina (DAB)³. Os núcleos foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, os cortes histológicos desidratados em seqüência de banhos de etanol com concentrações crescentes, em xilol e montadas com bálsamo do Canadá sob lamínula. Como controle positivo da detecção de linfócitos T e B foram utilizados cortes de linfonodos de cães. Como controle negativo da reação, a incubação com o anticorpo primário foi suprimido em uma das laminas.

3.8. Detecção e quantificação de Linfócitos T e B no tecido nervoso

A presença das células inflamatórias foi avaliada colorimetricamente, quantificando a porcentagem da área imunomarcada em relação à área total do tecido. A metodologia utilizada encontra-se descrita no Apêndice B. Foram analisadas 20 imagens relativas a 20 campos microscópicos (área de

¹ K0690 – Dako North America, Inc. – Via Real, CA

² Kit LSAB – Dako North America, Inc. – Via Real, CA

³ K3468 – Dako North America, Inc. – Via Real, CA

90.506,04 μm^2 por campo, na objetiva 40x) em quatro regiões encefálicas pré-definidas: (1) região de leptomeninge em córtex temporal e piriforme, (2) epêndima e zona sub-ependimária no hipocampo, (3) região de leptomeninge no tálamo, e (4) plexo coróide do ventrículo lateral, totalizando uma área de 1.810.120,7 μm^2 . A avaliação foi efetuada utilizando-se o *software* de análise de imagens Image-Pro Plus 6.1 (Media Cybernetics, Maryland, EUA). A leitura dos resultados foi feita sem o conhecimento do grupo experimental do animal. Os linfócitos T e B dos animais do Grupo 2, que foram previamente avaliados através de contagem manual em microscopia óptica (Melo et al., 2009), foram reavaliados com auxílio da captura e análise de imagem, para que os grupos fossem comparados com a utilização da mesma metodologia.

3.9. Análise estatística

Os valores referentes à porcentagem da área imunomarcada foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn, no nível de 5% de significância. Usando-se o teste exato de Fischer avaliou-se a associação entre as enfermidades. A correlação entre as variáveis foi medida pelo índice de Spearman. Os dados foram expressos pela mediana (estimador de medida de posição) e pelo intervalo interquartil (estimador de medida de dispersão), calculado como diferença dos valores dos percentis 75 e 25.

4. Resultados

4.1. Exame necroscópico e sorológico

As principais alterações encontradas durante o exame necroscópico dos animais com manifestações clínicas foram alopecia, emagrecimento, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, e lesões cutâneas. Alguns animais não apresentaram alteração macroscópica significativa. O exame macroscópico do encéfalo também não apresentou lesões macroscópicas significativas. Foram considerados positivos para Toxoplasmose e Neosporose, os soros de animais com título igual ou superior a 1:18 e 1:50, respectivamente (VARANDAS *et al.*, 2001). Não foi detectada associação entre leishmaniose visceral e a presença de anticorpos anti-*N. caninum* ($p=0,8029$) e também entre Leishmaniose e a presença de anticorpos anti-*T. gondii* ($p=0,1431$).

A Tabela 1 apresenta o diagnóstico sorológico dos animais pertencentes a cada um dos grupos experimentais. A presença simultânea de anticorpos anti-*L. chagasi*, anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* foi observada em 12 (22%) cães. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em quatro cães (7,27%), e anticorpos anti-*N. caninum* foi encontrado em oito animais (14,54%), dos 24 cães positivos para *L. chagasi*. Cerca de 31 cães apresentaram anticorpos séricos anti-*Leishmania sp.* Como a amostras desses animais, positivos para leishmaniose visceral e toxoplasmose e LV e neosporose foram muito pequenos, não seria o suficiente para formação de outros grupos, então foram utilizados para compor o grupo 1. Os resultados individuais da sorologia para

pesquisa de anticorpos anti-*L. chagasi*, anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* estão descritos no Apêndice A.

Tabela 1. Porcentagem de cães submetidos ao diagnóstico sorológico e parasitológico de leishmaniose visceral e da pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em 65 cães provenientes do município de Araçatuba – SP, 2009.

Grupo	Condição	Animais	
		N	%
1	<i>L. chagasi</i> positivo, <i>T. gondii</i> positivo e <i>N. caninum</i> positivo	12	21,8
1	<i>L. chagasi</i> positivo, <i>T. gondii</i> positivo e <i>N. caninum</i> negativo	4	7,27
1	<i>L. chagasi</i> positivo, <i>T. gondii</i> negativo e <i>N. caninum</i> positivo	8	14,54
2	<i>L. chagasi</i> positivo, <i>T. gondii</i> negativo e <i>N. caninum</i> negativo	31	56,36
	Subtotal	55	100,00
3	<i>L. chagasi</i> negativo, <i>T. gondii</i> negativo e <i>N. caninum</i> negativo	10	100,00
	TOTAL	65	100,00

4.2. Análise histopatológica

Durante a análise semi-quantitativa dos cortes histológicos, foi observada a presença de células inflamatórias mononucleares (linfócitos, macrófagos, plasmócitos) compondo o infiltrado inflamatório em diversas regiões encefálicas, principalmente nas leptomeninges do córtex piriforme e temporal, região endimária e sub-endimária ventricular e hipocampal, na região de leptomeninge no tálamo e no plexo coróide do ventrículo lateral (Figuras 1 e 2).

No Grupo 1 (co-infectados), foi observado um infiltrado inflamatório perivascular focal em áreas corticais, diencéfalo e plexo coróide, e áreas focais de micro-hemorragia. As lesões mais significativas do Grupo 2 (infectados apenas por *L. chagasi*) eram compostas por infiltrado mononuclear no plexo coróide e leptomeninges, além da ocorrência de hialinização na parede de vasos e a presença de reatividade endimária (formação de rosetas). Mínimas alterações foram encontradas nos animais do Grupo 3 (controle) e, quando presentes, consistiam em casos de hialinização perivascular no plexo coróide e eventuais células mononucleares isoladas, portanto sem caracterizar um infiltrado inflamatório.

Não foram observadas, no tecido nervoso dos cães, formas amastigotas típicas de *Leishmania sp*, tampouco cistos ou outras estruturas características de *T. gondii* e/ou *N. caninum*.

4.3. Análise imunoistoquímica

A Tabela 2 apresenta os valores da quantificação e o resultado da análise estatística referentes aos linfócitos T e B quando comparados os grupos experimentais. As figuras 3, 4 e 5 ilustram a detecção de células CD3+ e CD79+ por meio da técnica de imunoistoquímica, nas diferentes regiões estudadas. As células B e T foram detectadas principalmente nas leptomeninges, plexo coróide e em acúmulos perivasculares.

Os linfócitos T CD3+ foram detectados em maior número nos animais infectados dos grupos 1 e 2 ($p=0,0012$), quando comparados com os animais negativos (figura 06). Com relação às células B CD79+, não foi observada diferença significativa ($p=0,3604$) entre os grupos (figura 07). A análise da presença de células inflamatórias, segundo regiões específicas do encéfalo: plexo coróide, região de epêndima e sub-ependimária, e leptomeninges não resultou em diferença estatística para linfócitos T ($p = 0,8043$) e tampouco para linfócitos B ($p = 0,0714$).

Testando-se a correlação entre título de anticorpos e celularidade, não se encontrou diferença para *T. gondii* ($p = 0,7970$) nem para *N. caninum* ($p = 0,5857$). A correlação entre a intensidade de linfócitos T CD3+ e linfócitos B CD79+, foi significativa e de intensidade moderada.

Tabela 2. Porcentagem de área imunomarcada para células inflamatórias no encéfalo de cães com diagnóstico sorológico e parasitológico de leishmaniose visceral e **presença** de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* (Grupo 1), de cães com leishmaniose visceral, sem anticorpos anti-*T. gondii* e anti-*N. caninum* (Grupo 2) e de cães hígidos com sorologia negativa para leishmaniose visceral, toxoplasmose e neosporose (Grupo 3) provenientes do município de Araçatuba – SP. Dados apresentados na forma de mediana (intervalo interquartil).

Células	Grupo 1 n=24	Grupo 2 n= 31	Grupo3 n=10	p
Linfócito T CD3 ⁺	1,02 (2,38) ^a	1,66 (3,70) ^a	0,19 (0,14) ^b	0,0012
Linfócito B CD79 ⁺	0,01 (0,05)	0,00 (0,06)	0,00 (0,00)	0,3604

(ab) medianas seguidas de letra diferente diferem entre si (p< 0,05).

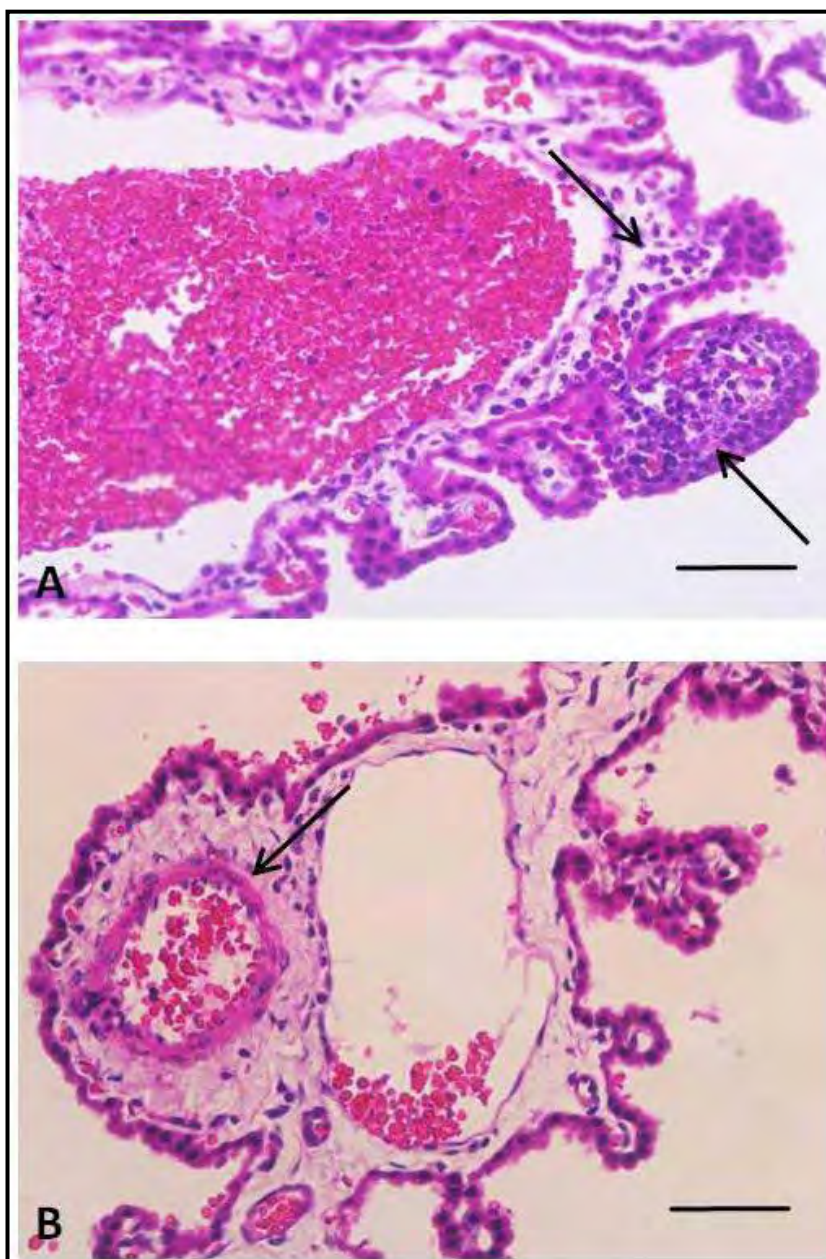


Figura 1. Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo de cães naturalmente acometidos por *L. chagasi*, *T. gondii* e/ou *N. caninum* (Grupo 1) **A-** Células inflamatórias em plexo coróide (seta). **B-** Depósito de substância hialina (seta) perivascular no plexo coróide (barra = 50 μ m). Hematoxilina e eosina. ARAÇATUBA- SP, 2009.

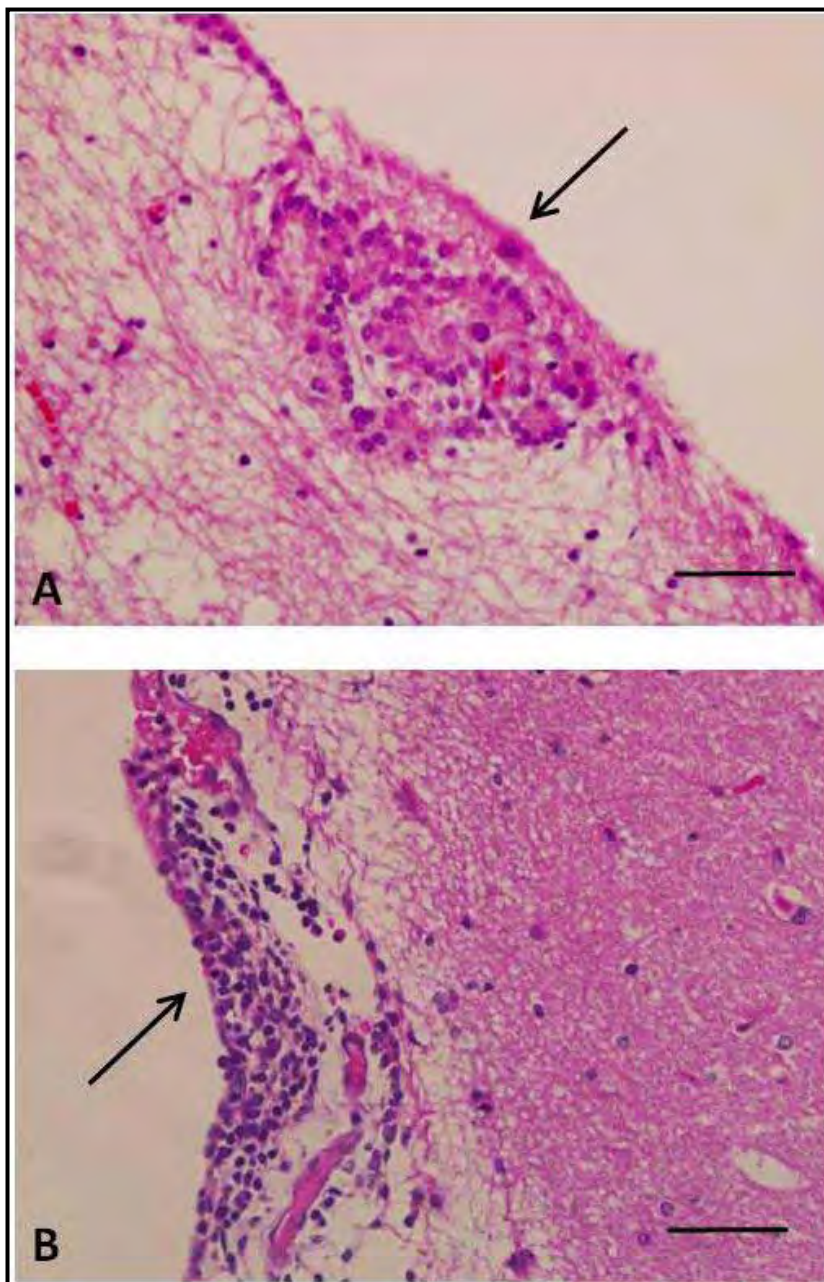


Figura 2: Fotomicrografias de encéfalo de cão. **A** - Presença de reatividade ependimária em ventrículo lateral caracterizada pela formação de roseta (seta) (Grupo 2). **B**- Infiltrado inflamatório mononuclear discreto em leptomeninge de região cortical (seta/ Grupo 1)(barra = 50 μ m). Hematoxilina e eosina. ARAÇATUBA – SP,2009.

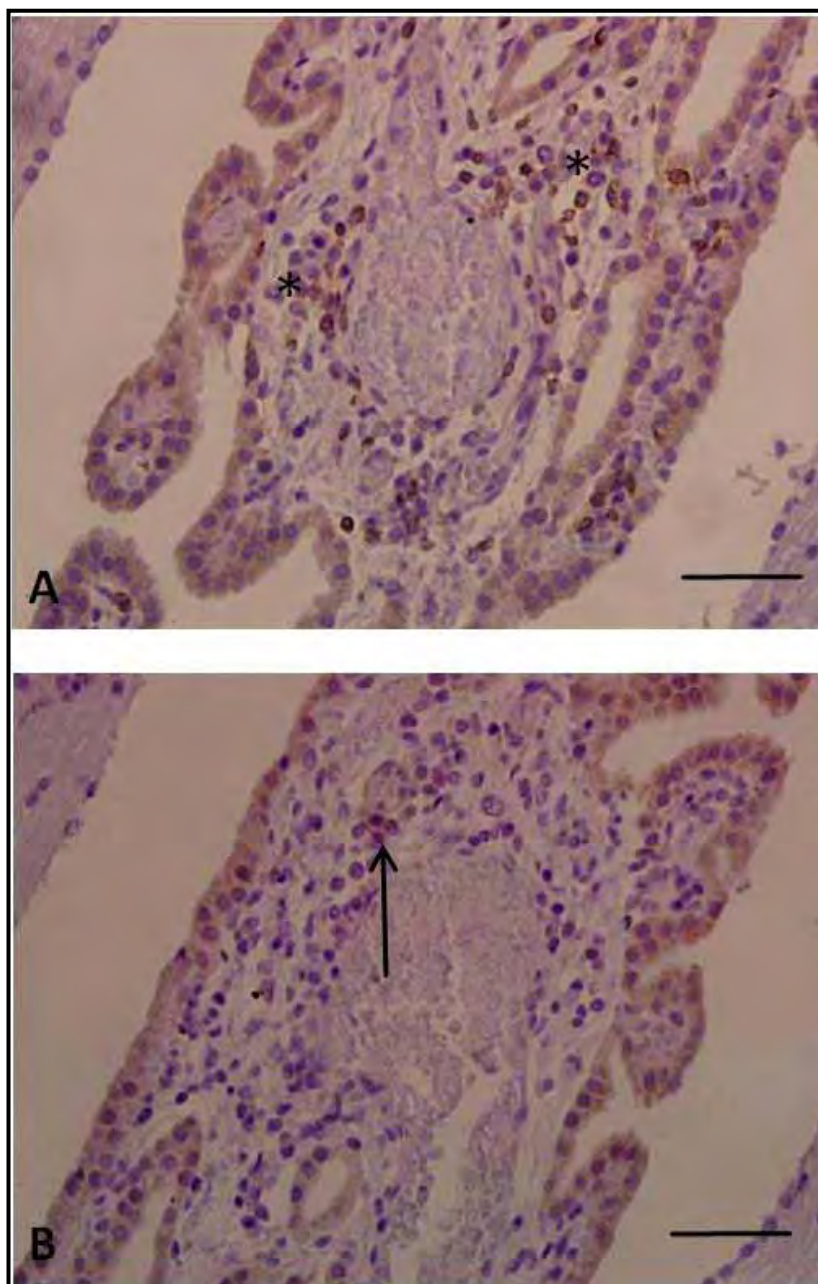


Figura 3: Fotomicrografias do encéfalo de cães com leishmaniose visceral. Imunomarcação de linfócitos T $CD3^+$ e linfócitos B $CD79^+$ **A- mostrando** linfócitos T $CD3^+$ perivascularres (*) em plexo coróide. **B,** mesmas regiões que A, raras células (setas) são positivas para o anticorpo anti- $CD79\alpha$ (barra = 50 μm). Complexo Estreptovidina e biotina peroxidase. ARAÇATUBA – SP, 2009.

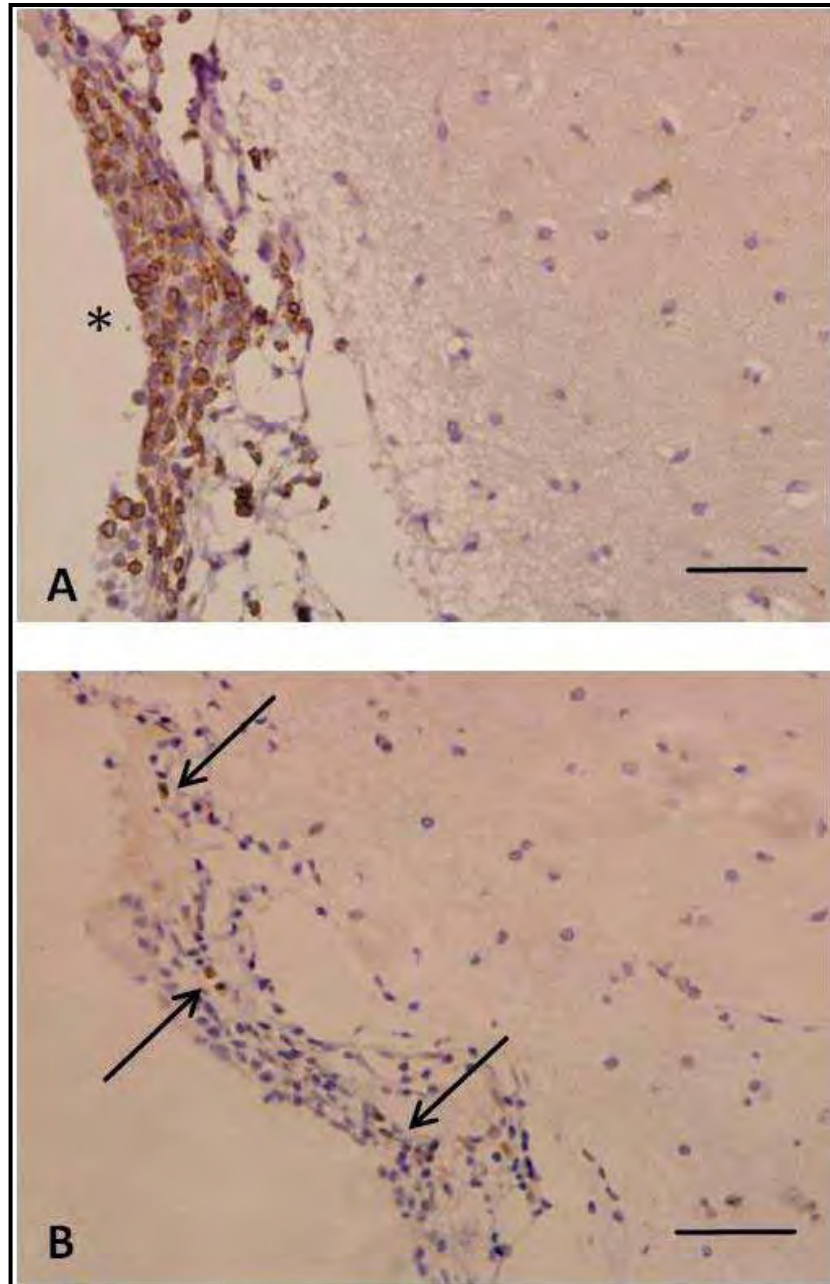


Figura 4: Fotomicrografias do encéfalo de cães com LV, mostrando os linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD79⁺ (*). **A-** Linfócitos T CD3⁺ compoendo principal população celular em infiltrado inflamatório em leptomeninge (*) de região cortical. **B,** nas mesmas regiões que A, raras células (setas) são positivas para o anticorpo anti-CD79α (barra = 50 μm). Complexo estreptovidina biotina peroxidase. ARAÇATUBA – SP, 2009.

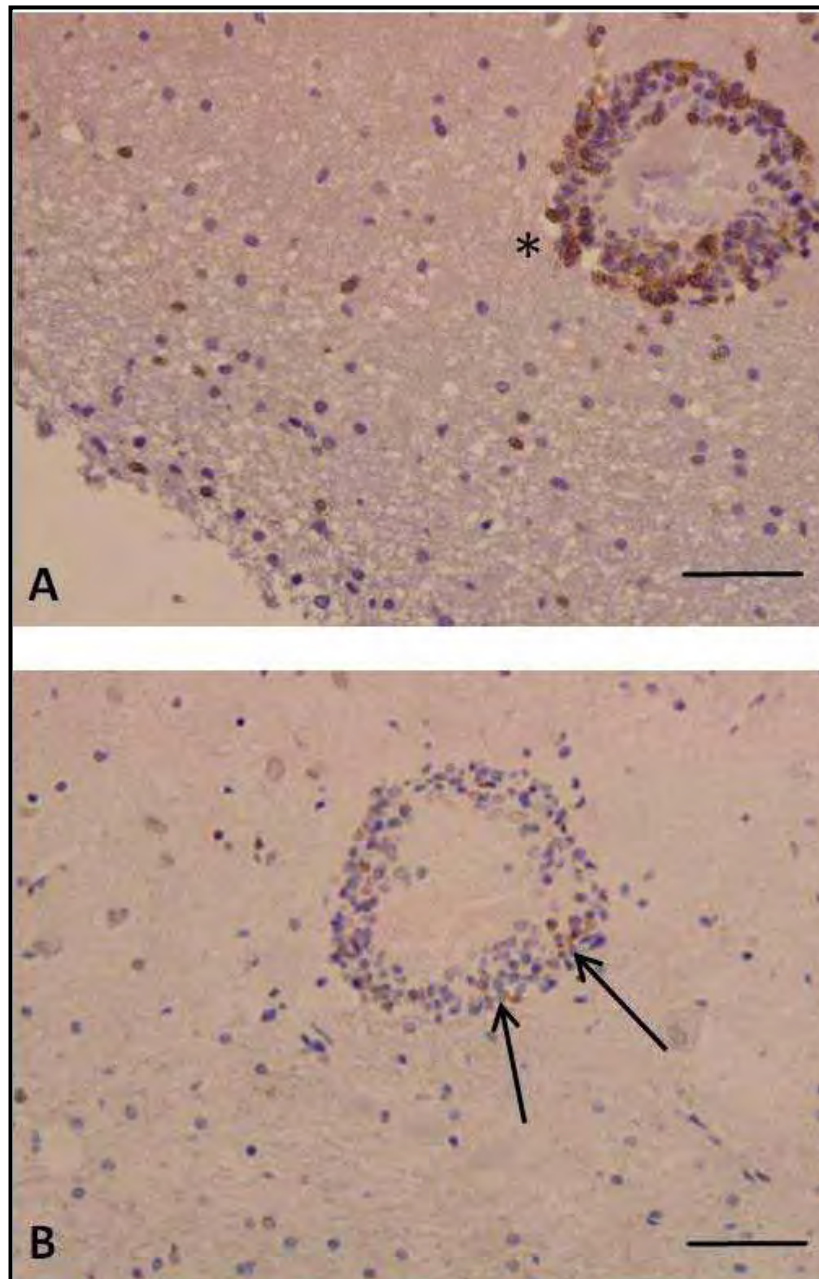


Figura 5: Fotomicrografias do encéfalo de cães com LV, mostrando linfócitos T $CD3^+$ e linfócitos B $CD79^+$. **A-** Manguito perivascular em região talâmica composto principalmente por células T $CD3^+$. **B,** nas mesmas regiões que A, raras células (setas) são positivas para o anticorpo anti- $CD79\alpha$ (barra = 50 μm). Complexo estreptovidina biotina peroxidase. ARAÇATUBA – SP, 2009.

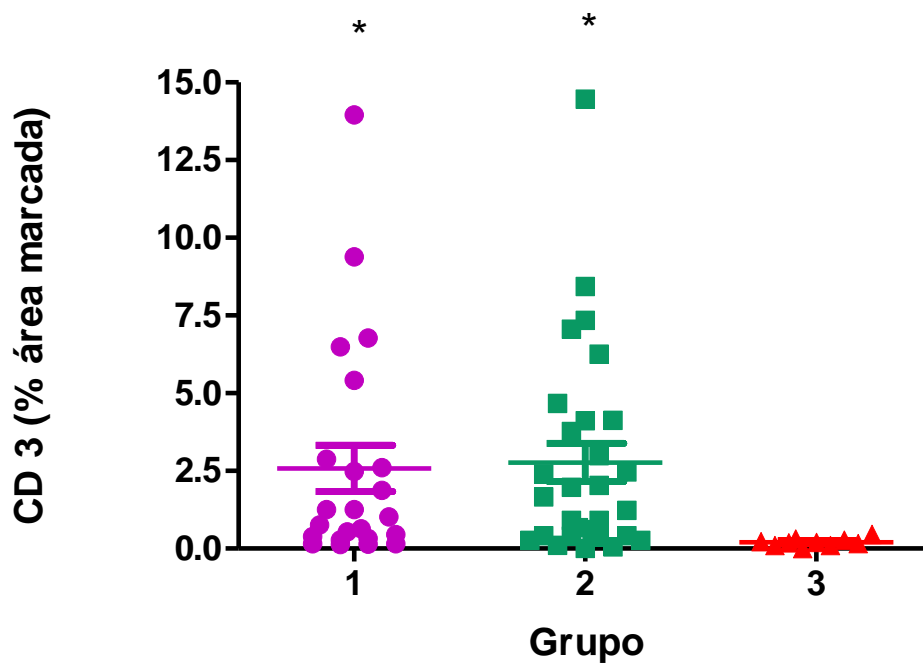


Figura 6. Porcentagem de linfócitos T CD 3+ encontrados no encéfalo de cães com leishmaniose visceral e co-infecção por *T. gondii* e *N. caninum* (Grupo 1), em cães, apenas, com leishmaniose visceral (Grupo 2) e em cães hígidos com sorologia negativa para leishmaniose visceral, toxoplasmose e neosporose (Grupo 3) provenientes do município de Araçatuba – SP, 2008 . Avaliado colorimetricamente pelo *software* Image-Pro Plus 6.1. As linhas horizontais indicam a mediana e o intervalo interquartil (* indica $p < 0,05$).

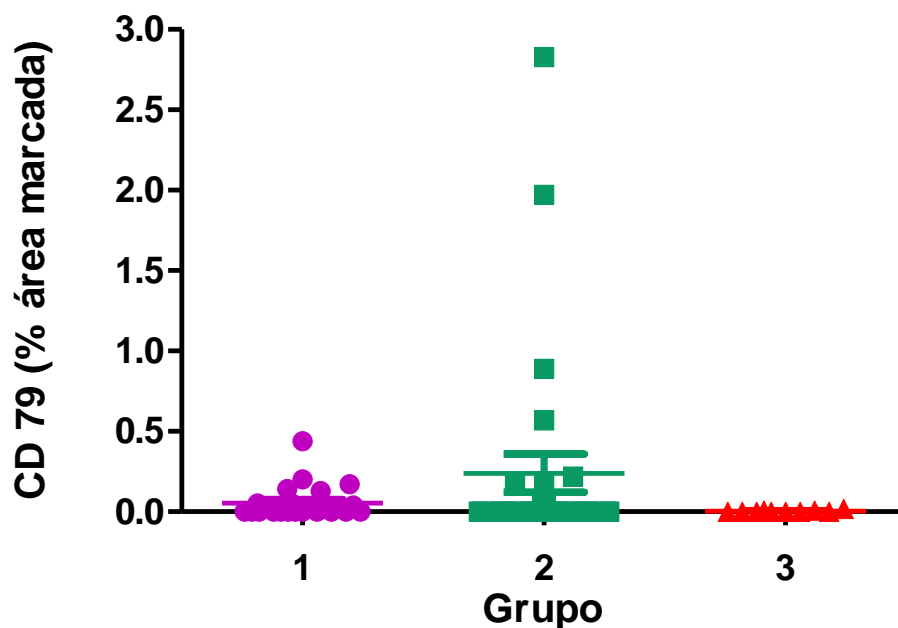


Figura 7. Porcentagem de linfócitos B CD 79+ encontrado no encéfalo de cães com leishmaniose visceral e co-infecção por *T. gondii* e *N. caninum* (Grupo 1), em cães, apenas, com leishmaniose visceral (Grupo 2) e em cães hígidos com sorologia negativa para leishmaniose visceral, toxoplasmose e neosporose (Grupo 3) provenientes do município de Araçatuba – SP, 2008 . Avaliado colorimetricamente pelo *software* Image-Pro Plus 6.1. As linhas horizontais indicam a mediana e o intervalo interquartil.

5. Discussão

No presente estudo, não foi verificada uma associação entre as doenças, sendo que dos cães positivos para leishmaniose, 67% (16/24) apresentaram títulos de anticorpos anti-*T. gondii* e 83% (20/24) anti-*N. caninum*, enquanto que dos cães negativos para leishmaniose nenhum dos animais possuíam titulação positiva para toxoplasmose e/ou neosporose.

Os sinais clínicos observados nos cães do presente estudo coincidem com os dados da literatura, onde a leishmaniose visceral (LV) é descrita como uma enfermidade caracterizada por perda progressiva de peso e caquexia (Genaro,1993; Noli, 1999), alterações dermatológicas, onicogribose, linfadenopatia, hepatosplenomegalia, alterações renais, pneumonia, miocardite, distúrbios locomotores, diáteses hemorrágicas e alterações oculares (CIARAMELLA et al., 1997; NOLI, 1999; MACHADO et al., 2007). Foi observado, também, ausência de sintomas em grande número de animais que apresentaram exame sorológico e/ou citológico positivo para *Leishmania chagasi*, concordando com os relatos de Machado et al. (2007), os quais afirmaram que os animais infectados podem permanecer assintomáticos por longos períodos, podendo ou não desenvolver a doença posteriormente.

Não foi levada em consideração no presente estudo, a presença ou não de sintomas compatíveis com o diagnóstico de leishmaniose para a composição dos grupos. Nenhum dos cães utilizados no experimento apresentou sinais neurológicos e tampouco alterações específicas relacionadas com toxoplasmose ou neosporose.

Em relação às alterações morfológicas observadas no exame histopatológico do tecido nervoso dos cães dos Grupos 1 e 2, observou-se lesões inflamatórias caracterizadas pelo acúmulo focal a multifocal coalescente, de células mononucleares principalmente em leptomeninges, no plexo coróide e ao redor de vasos. Não houve diferença significativa entre os grupos, mas houve uma variação individual no número de células detectadas (figuras 4 e 5) que pode estar relacionada ao tempo diferente de infecção de cada animal pela *Leishmania chagasi*.

No presente estudo foi observado marcação positiva de linfócitos T CD3+ em cães do Grupo 1 e 2, sem diferenças significativas, portanto a co-infecção não alterou a quantidade de células nem a distribuição das mesmas no tecido, concordando com Marcondes (2008) ao estudar 21 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* com sintomas decorrentes de alterações no SNC e 18 cães sem evidências clínicas de comprometimento neurológico onde também foi observada a presença de marcação positiva para a pesquisa de linfócitos T CD3+ em todos os animais (100%) principalmente em região perivascular e no plexo coróide do ventrículo lateral e com os resultados obtidos por Melo et al. (2009) que detectaram um influxo de linfócitos T CD3+, principalmente no plexo coróide dos cães com LV.

Embora considerado como um órgão imunologicamente privilegiado, o encéfalo dos animais com LV, co infectados ou não com outros patógenos, apresentou infiltrado celular semelhante ao descrito em outros tecidos de animais parasitados, com presença de acúmulos de linfócitos T, observado por Keenam et al. (1984), Tafuri et al. (2001), sem a observação de parasitas no

tecido nervoso. Por outro lado, não houve presença de número significativo de linfócitos B no encéfalo destes mesmos animais.

A diversidade da resposta imune entre os hospedeiros e entre os órgãos e tecidos infectados é bastante complexa na LV. Nos encéfalos avaliados neste trabalho, não foram detectadas formas amastigotas associadas à presença de células inflamatórias no tecido nervoso, o que sugere que a ativação da resposta imune sistêmica promove a ativação de linfócitos e a migração dos mesmos para o tecido nervoso, via leptomeninges e plexos coróides, o que pode comprometer a BHE concordando com os relatos de HICKEY, (1991); Williams e Hickey, (1995) e Weller (1996), que afirmaram que apenas células T ativadas são capazes de cruzar a BHE e realizar a vigilância imunológica do SNC.

No presente trabalho, não foram detectadas formas amastigotas do parasita, mas observou que também as células inflamatórias parecem se aproveitar dos pontos de “fragilidade” das barreiras cerebrais para invadir o SNC, podendo levar ao aparecimento de alterações teciduais e déficits neurológicos mesmo na ausência de parasitas. Este fato discorda dos trabalhos de Garcia-Alonso et al. (1996), Nieto et al. (1996) e Viñuelas et al. (2001), afirmaram ter encontrado os parasitas nas meninges e no plexo coróide nos cães com a forma nervosa da LV. Entretanto, o fato do parasita não ter sido detectado nos animais deste experimento pode estar relacionado ao diferente tempo de infecção.

A ativação e participação de macrófagos/micróglia e astrócitos não ficou evidente nas lesões observadas no encéfalo dos animais estudados, ao menos nos cortes corados pela hematoxilina-eosina. Não foram feitas marcações com

anticorpos específicos para este tipo celular, entretanto não é possível descartar a ativação da micróglia pelos linfócitos T (CD3+) e também a contribuição de astrócitos na patogenia das lesões observadas, uma vez que a micróglia é bastante sensível às alterações na hemostasia do tecido nervoso conforme afirmaram Ransohoff e Perry (2009) e Tambuyzer et al. (2009), e os astrócitos podem ter uma ação moduladora sobre a micróglia (Min et al., 2006)

A detecção de linfócitos B (CD79+) no encéfalo dos cães foi muito pequena, e não foram observadas diferenças entre os grupos. Portanto, a produção de anticorpos anti-leishmania não parece ser intratecal, e sim resultado de alterações na permeabilidade da barreira hemato-liquórica concordando com Lima et al. (2004) e Melo et al. (2009). O número reduzido de linfócitos B detectados, reforçam os resultados obtidos por Marcondes (2008) em relação à ativação do sistema imunológico e à sua provável relação com as lesões observadas no tecido nervoso.

O envolvimento do sistema nervoso central na LV ainda não foi totalmente elucidado, mas nossos resultados confirmaram a participação de linfócitos T CD3+ corroborando com o relato de Marcondes (2008) e Melo et al. (2008).

Como existe uma grande variabilidade da resposta imune na LV tanto individualmente como em diferentes órgãos e uma vez que o SNC apresenta muitas particularidades no que diz respeito a modulação da inflamação e da resposta imune, estudos posteriores devem ser realizados para auxiliar o entendimento do papel dos linfócitos T e o envolvimento das células gliais na patogênese da leishmaniose visceral no sistema nervoso.

6. Conclusões

- Cães com leishmaniose visceral e com anticorpos séricos anti- *Toxoplasma gondii* e/ou *Neospora caninum* diferem na quantidade de linfócitos T CD3+ detectados quando comparados com cães hígidos.
- A presença de numero elevado de linfócitos T CD3+ nos grupos G1 e G2 quando comparados ao grupo controle (G3) reforça a idéia do envolvimento destas células na patogenia das lesões que resultam nos sinais neurológicos observados em cães com LV.
- Cães com leishmaniose visceral e com anticorpos séricos anti- *Toxoplasma gondii* e/ou *Neospora caninum* não diferem quanto a quantidade de linfócitos B CD79+ detectados quando comparados com cães hígidos.
- Os linfócitos B aparentemente não estão envolvidos de forma direta na patogenia da encefalite dos cães com LV.
- Cães com LV e sorologia positiva para *T. gondii* e/ou *N. caninum* (Grupo1) não apresentam alteração na quantidade de linfócitos T CD3+ no tecido nervoso quando comparados com cães com LV (Grupo2).
- Não houve diferença evidente entre lesões neurológicas dos animais com LV e com anticorpos séricos anti- *Toxoplasma gondii* e/ou *Neospora caninum*.

Referências

ABBOTT, N.J., PATABENDIGE, A.A.K., DOLMAN, D.E.M., YUSOF, S.R., BEGLEY, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology of disease**, v.37, p. 13-25, 2009.

ABREU, C.B.; NAVARRO, I.T.; BALARIN, M.R.S.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; MARANA, E.R.M.; TRAPP, S.M.; FUGINAKA, C.A.; PRUDÊNCIO, L.B.; MATOS, M.R.; TSUTSUI, V.S. Aspectos clínicos, patológicos e sorológicos da toxoplasmose experimental em cães jovens. **Semina: Ci. Agrárias**, v.22, n.2, p.123-130, 2001.

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; TEDESCO, R.C.; MORTARA, R.A.; da COSTA, S.C. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Am J Trop Med Hyg.** v.68, n.6, p.661-5, 2003.

ALOISI, F.; De SIMONE, R.; COLUMBA-CABEZAS, S.; PENNA, G.; ADORINI, L. Functional maturation of adult mouse resting microglia into an APC is promoted by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interaction with Th1 cells. **J Immunol.**, v15; n.4, p.1705-12, 2000.

ARAÚJO, F.G. Depletion of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Infect Immunol.**, v.59,p.1614-1619, 1991.

AVERRIL, D.R.; LAHUNTA, A.de. Toxoplasmosis of The Canine Nervous System: Clinicopathological Findings in Four Cases. **J.A.V.M.A.**, v.159, p.1134-1141, 1971.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiol Dis.** v.16, n.1, p1-13, 2004.

BARBIÉRI CL. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.28, p.329-377, 2006.

BARKER, C.F.; BILLINGHAM, R.E. Immunologically privileged sites. **Adv Immunol.** v.25, p.1-54, 1977.

BAUER, J.; BRADL, M.; HICKEY, W.F.; FORSS-PETTER, S.; BREITSCHOPF, H.; LININGTON, C.; WEKERLE, H.; LASSMANN, H. T-Cell apoptosis in inflammatory brain lesions: Destruction of T cells does not depend on antigen recognition. **Am J Pathol.** v.153, n.3, p.715-724, 1998.

BECHER, B., PRAT, A., ANTEL, J. Brain-Immune connection: immunoregulatory properties of CNS – resident cells. **Glia.** v. 29, p. 293-304, 2000.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J.P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.9, n.4, p.439-440, 1997.

BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J.; NAVARRO, I.T.; TONIOLLO, G.H.; SAKAMOTO, C.A.M.; ARANTES, T.P.; GENNARI, S.M. Toxoplasmose canina: aspectos clínicos e patológicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.189-202, 2008.

BRUZZONE, R., DUBOIS-DALCQ, M., GRAU, G.E., GRIFFIN, D.E., KRISTENSSON, K. Infectious diseases of the nervous system and their impact in developing countries. **Plos pathogens**, v.5, n.2, p.1-3, 2009.

BURACCO, P.; ABATE, O.; GUGLIELMINO, R. *et al.* Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. **J Small Anim Pract**, v.38, p.29-30, 1997.

CARRITHERS, M.; VISINTIN, L.; KANG, S.J.; JANEWAY, C.A. Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. **Brain**. v.123, p.1092-1101, 2000.

CHARLIER C, CHRETIEN F, BAUDRIMONT M, MORDELET E, LORTHOLARY O, DROMER F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. **Am J Pathol**. v.166, n.2, p.421-32, 2005.

CIARAMELLA, P., OLIVA, G., DE LUNA, R. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by leishmania infantum. **Vet Rec.**, v.141, p.539-543, 1997.

CIARAMELLA, P. CORONA, M., Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 25, n.5, p. 358-368, 2003.

CORBERTT, C.E.P., PAES, R.A., LAURENTI, M.D., ANDRADE JUNIOR, H. F., DUARTE, M.I. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**. v.73, n.4, p.417- 433, 1992.

CORBERTT, C.E.P., LAURENTI, M.D., NUNES, E.V., GAMA-RODRIGUES, J.J., OKUMURA, M. CYTOKINES AND CHAGAS disease in mice. **Revista do Hospital das Clinicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo**, v. 53, n.1, p.1-2, 1998.

COLTON, C.A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. **J. Neuroimmune Pharmacol**, v. 4, p. 399-418, 2009.

CORCIONE, A., CASAZZA, S., FERRETI, E., GIUNTI, D., ZAPPIA, E., PISTORIO, A. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous

system of patients with multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, p. 11064-11069, 2004.

CRINGOLI, G.; RINALDI, L.; CAPUANO, F.; BALDI, L.; VENEZIANO, V.; CAPELLI, G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. **Vet Parasitol.** v.106, p.307-313, 2002.

DARSAUD, A.; BOURDON, L.; CHEVRIER, C.; KEITA, M.; BOUTEILLE, B.; OUEYROU, A.; CANINI, F.; CESPUGLIO, R.; DUMAS, M.; BUGUET, A. Clinical follow-up in the rat experimental model of African trypanosomiasis. **Exp Biol Med (Maywood)**. v.228, n.11, p.1355-62, 2003.

DAY, M.J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. **Vet. Parasitol.** 147, 2-8. 2007.

DEANE, R., BELL, R.D., SAGARE, A., ZLOKOVIC, B.V. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 8, p. 16-30, 2009.

DECKERT, M.; SEDGWICK, J.D.; FISCHER, E.; SCHLÜTER. Regulation of microglial cell responses in murine *Toxoplasma* encephalitis by CD200/CD200 receptor interaction. **Acta Neuropathol.**, v.111, p.548-558, 2006.

DHEEN, S.T., KAUR, C., LING, E.A. Microglial activation and its implications in the brain diseases. **Curr. Med. Chem.** v. 14, n. 11, p. 1189 – 1197, 2007.

DORAN, K.S.; ENGELSON, E.J.; KHOSRAVI, A.; MAISEY, H.C.; FEDTKE, I.; EQUILS, O.; MICHELSEN, K.S.; ARDITI, M.; PESCHELA, A.; NIZET, V. Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. **J Clin Invest.** v. 115(9):2499-507, 2005

DORAN, K.S.; ENGELSON, E.J.; KHOSRAVI, A.; MAISEY, H.C.; FEDTKE, I.; EQUILS, O.; MICHELSEN, K.S.; ARDITI, M.; PESCHELA, A.; NIZET, V. Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. **J Clin Invest.**, v. 115(9):2499-507, 2005.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC, 1988.

DUBEY, J.P.; DOROUGH, K.R.; JENKINS, M.C.; LIDELL, S.; SPEER, C.A.; KWOKA, O.C.H.; SHEN, S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. **Int J Parasitol.**, v.28, p.1293-1304, 1998.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Vet Parasitol.**, v.67, p.1-59, 1996.

ENGELHARDT, B; RANSOHOFF, R.M. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. **Trends Immunol.** v.26, n.9, p.485-495, 2005.

FARINA, C., ALOISI, F., MEINL, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. **Trends in immunology**, v. 28, n. 3, p. 138-145, 2007.

FEITOSA, M.F.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com Leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clin Vet.** n. 28, p.36-44, 2000.

FEITOSA, M.M., LUVIZOTTO, M.C.R., FEITOSA, F.L.F. Alterações do líquido de cães com encefalite por cinomose e suas correlações com as alterações anatomopatológicas do sistema nervoso central. **ARS Veterinária**, v.13, p.6-16, 1997.

FERRER, L. RABANAL, R.M.; DOMINGO, M.; RAMOS, J.A.; FONDEVILA, D.

Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Research in Veterinary Science**, v.44, p.194-196, 1988.

FERRER, L. Leishmaniasis. In: KIRK, R.W., BONAGURA, J.D.(ed). Kirk's Current Veterinary Therapy XI. Philadelphia, p.266-270, 1972.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla, Spain. Proceeding...Salamanca: Intervet bv, p. 21-24, 2002.

FRENKEL, J. K.; PARKER, B. B. An apparent role of dogs in the transmission of *Toxoplasma gondii* . The probable importance of xenosmophilia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.791, p.402-407, 1996.

GARCIA-ALONSO, M., NIETO, A.G., BLANCO, A. *et al.* Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasit. Immunol.**, v.18, p.539-546, 1996.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, 202p, 1993. (Tese).

GENNARI, S.M., FRANCO, W.A.C-, FEITOSA, M.M., IKEDA, F.A.. LIMA, V.M.F., AMAKU, M. Presence of anti-Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs with visceral leishmaniosis from the region of Araçatuba, São Paulo, Brazil. **Braz J Vet Res Sci.**, v.43, p.613-619, 2006.

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M. J.; TAFURI, W. L.; OLIVEIRA, R. C.; REIS, A. B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 121, p. 23–33, 2008.

GOMES, A.A.D. Avaliação imunoquímica da musculatura estriada esquelética em cães com leishmaniose visceral. 2008. 90f. Dissertação (mestrado). Universidade Júlio de Mesquita Filho, 2008.

GOTTSCHALL, P.E.; DEB, S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. **Neuroimmunomodul**, v.3, p.69-75, 1996.

GRAB, D.J.; PERIDES, G.; DUMLER, J.S.; KIM, K.J.; PARK, J.; KIM, Y.V.; NIKOLSKAIA, O.; CHOI, K.S.; STINS, M.F.; KIM, K.S. *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. **Infect Immun**. v.73, n.2, p.1014-22, 2005.

GRAB, D.J., KENNEDY, P.G.E. Transversal of human and animal trypanosomes across the blood-brain barrier. **Journal of Neurovirology**, v.14, n.5, p. 344-351, 2008.

GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia, 3 ed., 2006.

GUIMARÃES JR, J.S.; ROMANELLI, P.R. Neosporose em Animais Domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.4, p.665-678, 2006.

HICKEY, W.F., HSU, B.L., KIMURA, H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. **J.Neurosci Res**. v.28, p.254-260, 1991.

HIPPENSTIEL, S., SUTTORP, N., Interaction of pathogens with the endothelium . **Tromb Haemost.**, v. 89, p.18-24, 2003.

HIRAYAMA, K.; YOKOTA, H.; ONAI, R.; KOBAYASHI, T.; KUMATA, T.; KIHARA, K.; OKAMOTO, M.; SAKO, T.; NAKADE, T.; IZUMISAWA, Y.; TANIYAMA, H. Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. **J Comp Pathol**. v.127, n.4, p.249-56, 2002.

HUANG S.H., JONG A.Y. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. **Cell Microbiol.** v.3, n.5, p277-87, 2001.

HUDSON, L.C., BRAGG, D.C., TOMPKINS, M.B., MEEKER, R.B. Astrocytes and microglia differentially regulate trafficking of lymphocyte subsets across brain endothelial cells. **Brain Research**, v. 1058, p. 148-160, 2005.

IKEDA, F.A., LAURENTI, M.D., CORBETT, M.E., FEITOSA, M.M., MACHADO, G.F., PERRI, S.H.V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 5-11, 2007.

KARAK, B., GARG, R.K., MISRA, S. *et al.* Neurological manifestations in a patient with visceral leishmaniasis. **Postgrad. Med. J.**, v.74, p.423-425, 1998.

KEENAM, C. M., HENDRICKS, L. D., LIGHTNER, L., WEBSTER, H. K., JOHNSON, A. J. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical, disease, and clinical pathology. **Veterinary Pathology**, v.21, n. 1, p. 74-79, 1984.

KHUTH, S.T.; AKAOKA, H.; PAGENSTECHER, A.; VERLAETEN, O.; BELIN, M.F.; GIRAUDON, P.; BERNARD, A. Morbillivirus infection of mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. **J Virol.**, v.75, p.8268-82, 2001.

KIM KS. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. **J Infect Dis.**, v.186 Suppl 2:S220-4, 2002.

KIVISÄKK, P.; MAHAD, D.J.; CALLAHAN, M.K.; TREBST, C.; TUCKY, B.; WEI, T.; WU, L.; BAEKKEVOLD, E.S.; LASSMANN, H.; STAUGAITIS, S.M.; CAMPBELL, J.J.; RANSOHOFF, R.M. Human cerebrospinal fluid central

memory CD4+ T cells: Evidence for trafficking through choroids plexus and meninges via P-selectin. **P Natl Acad Sci USA**. v.100, n.14, p.8389–8394, 2003.

KLEINER, D.E.; STETLER-STEVENSON, W.G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Anal Biochem**. v.218, n.2, p.325-9, 1994.

KNOPF, P.M., HARLING-BERG, C.J., CSERR, H.F., BASU, D., SIRULNICK, E.J., NOLAN, S.C. Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells. **J. Immunol**, v. 161, p. 692-701, 1998.

KUROKI, K.; KREEGER, J.M.; COOK, J.L.; TOMLINSON, J.L.; JOHNSON, C.G.; PACE, L.W. TURQUIST, S.E.; TURK, J.R.; RAMOS, J.A.; MILLER, M.A. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase-1, -3, and -13 in naturally occurring cartilaginous tumors of dogs. **Am J Vet Res**. v.63, n.9, p.1285-91, 2002.

LEIB, S.L.; LEPPERT, D.; CLEMENTS, J., TAUBER, M.G. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. **Infect Immunol**. v.68, p.615-620, 2000.

LEPPERT, D.; WAUBANT, E., GALARDY, R., BUNNETT, N.W.; HAUSER, S.L. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. **J Immunol**. v.154, p.4379-89, 1995.

LEVINE, S. Choroid plexus: Target for systemic diseases and pathway to the brain. **Laboratory Invest**. v.56, p.231-233, 1987.

LIMA, V.M.F., GONÇALVES, M.E., IKEDA, F.A., LUVIZOTTO, M.C.R., FEITOSA, M.M., Anti-Leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 36, 485–489, 2003.

LIMA, W.G., MICHALICK, M.S.M., DE MELO, M.N., TAFURI, W.L., TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Trop.** 92, 43–53, 2004.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; DUNCAN, R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. **Vet Parasitol.**, v.82, p.327-333, 1999.

LINDSAY, D.S.; STEINBERG, H.; DUBIELZIG, R.R.; SEMRAD, S.D.; KONKLE, D.M.; MILLER, P.E.; BLAGBURN, B.L. Central nervous system neosporosis in a foal. **J Vet Diagn Invest.**, v.8, p.507-510, 1996.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALES, M.; GINEL, P.J.; MARTIN, E.; MOLLEDA, J.M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Zentralblatt für Veterinärmedizin.** v.43, n.8, p.469-474, 1996.

LOSSINSKY A.S., SHIVERS R.R. Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. **Histol Histopathol.** v.19, n.2, p.535-64, 2004.

LUCAS, S.M., ROTHWELL, N.J., GIBSON, R.M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 232-240. 2006.

MACHADO, J.G.; HOFFMANN, J.L.; LANGONI, H. Imunopatologia da leishmaniose visceral canina. **Clin Vet.** n.71, p.50-58, 2007.

MACINTYRE, A., ABRAMOV, R., HAMMOND, C.J., HUDSON, A.P., ARKING, E.J., LITTLE, C.S., APPELT, D.M., BALIN, B.J. Chlamydia pneumoniae infection promotes the transmigration of monocytes through human brain endothelial cells. **J. Neurosci. Res.**, v.71, p. 740-750, 2003.

MARCONDES, M. Envolvimento do sistema nervoso central na leishmaniose visceral canina. 2009. 154f. Tese (Livre-docência). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista – Araçatuba, 2009.

MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v. 16, n. 5, p.188-189, 2000.

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.** v.162, p.248-256, 2009.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, p. 67-83, 2007.

MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.58, n.5, p.928-937, 1972.

MIN, K.J.; YANG, M.S.; KIM, S.U.; JOU, H.; JOE, E.H. Astrocytes Induce Hemeoxygenase-1 Expression in Microglia: A Feasible Mechanism for Preventing Excessive Brain Inflammation. *The Journal of Neuroscience*, v. 26, p. 1880 –1887, 2006

MOREIRA, M.A.B; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.245, 2007.

MORENO, P., LUCENA, R., GINEL, P.J. Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. **Vet Rec.**, v.142, p.81-83,1998.

MORETTI, L. D.; UENO, T. E.; RIBEIRO, M. R.; AGUIAR, D. M.; PAES, A. C.; PEZERICO, S. B.; SILVA, A. V. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. **Semina: Ciências Agrárias**, v.23, n.1, p.85-91, 2002.

MOSER, B., LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nat. Immunol.** V.2, n.2, p. 123-128, 2001.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Infecções Protozoárias Polissistêmicas IN: **Fundamentos de Medicina Interna de Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Kooogan, p.1262. 2006..

NESBIT, J.W.; LOORENS, DC.; WILLIAMS, M.C. Spatic paresis in two Littermate pups caused by *Toxoplasma gondii*. **J. S. Afr. Veter. Assoc.**, v. 52, p. 243-246, 1981.

NIETO, C.G., NAVARRETE, I., HABELA, M.A. *et al.* Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Vet Parasitol.** v.45, p.33-45,1992.

NIETO, C.G., VIÑUELAS, J., BLANCO, A. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Vet Rec.**, v.139, p.346-347,1996.

NIMMERJAHN, F., & Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v.8,p. 34–47, 2008.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**. v.9, p.16-24,1999.

OKUN, E., MATTSON, M. P., ARUMUGAM, T. Involvement of Fc Receptors in Disorders of the Central Nervous System. **Neuromolecular Medicine**, 2009.

OPPERMANN, W.H. Versuche zun experimentellen infection des hundes mit Toxoplasma- oozysten. Dissertation (Inaugural) – Universitat Berlin, Inst. Fur Parasitologie des Fachbereiches Veterinarmedizin, Berlin. 31p. 1971.

PANARO, M.A., BRANDONISIO, O., CIANCIULLI, A., CAVALLO, P., LACASELLA, V., PARADIES, P., TESTINI, G., CAPRARIIS, D. DE, MITOLO, V., OTRANTO, D. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Parasitology**, v. 136, n.8, p. 823-831, 2009.

PAPPARELLA S, B RESTUCCI B, PACIELLO O, MAIOLINO P. Expression of Matrix Metalloprotease-2 (MMP-2) and the Activator Membrane Type 1 (MT1-MMP) in Canine Mammary Carcinomas. **J Comp Pathol.** v.126, n.4, p.271-6, 2002.

PEDEMONTE, E., MANCARDI, G., GIUNTI, D., C CORCIONE, A. BENVUTO, F., PISTOIA, V., UCCELLI, A. Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p. 555-566, 2006.

PERRY, V.H. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. **Brain Behav. Immun.**, v. 18, p. 407-413, 2004.

PETITO, C.K.; ADKINS, B. Choroid plexus selectively accumulates T-lymphocytes in normal controls and after peripheral immune activation. **J Neuroimmunol.** v.162, n.1-2, p.19-27, 2005.

RANSOHOFF, R.M., PERRY, V.H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu. Rev. Immunol.** v.27, p. 119-145, 2009.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.**, v.128, n.1-3, p.87-95, 2009.

ROCK, R.B.; GEKKA, G; HU, S.; SHENG, W.S.; CHEERAN, M.; LOKENSGARD, J.R.; PETERSON, P.K. Role of microglia in CNS Infections. **Clin Microbiol Rew.** v.17, n.4, p.942-964, 2004.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1993.

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos de Imunologia**, 10.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 490 p, 2004.

ROMANIC, A.M.; BURNS-KURTIS, C.L.; GOUT, B.; BERREBI-BERTRAND, I.; OHLSTEIN, E.H. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. **Life Sci.** v.68, n.7, p.799-814, 2001.

ROSEMBERG, G.A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia.** v.39, p.279-291, 2002.

RUIZ, A.; FRENKEL, J. K.; CERDAS, L. Isolation of *toxoplasma* from soil. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.59, n.1, p.204-206, 1973.

SCHAER, M., MEYER, D.J., YOUNG, D.G. A Dual Infection of *Leishmania donovani* and *Ehrlichia canis* in a Dog. **Compendium on Continuing Education**, v.7, p.531-534,1985.

SCHARES, G.; PANTCHEV, N.; BARUTZKI, D.; HEYDORN, A. O.; BAUER, C; CONRATHS, F. J. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.35, n.14, p.1525-1537, 2005.

SEABROOK, T.J., JOHNSTON, M., HAY, J. B. Cerebral spinal fluid lymphocytes are part of the normal recirculating lymphocyte pool. **J. Neuroimmunol**, v. 91, p.100-107, 1998.

SEIWA, C., YAMAMOTO, M., TANAKA, F., FUKUTAKE, M., UEKI, T., TAKEDA, S., SAKAI, R., ISHIGE, A., WATANABE, K., AKITA, M., YAGI,T., TANAKA, K., ASOU, H. Restoration of FcRgamma/Fyn signaling repairs

central nervous system demyelination. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, p. 954–966, 2007

SHARMA, S.P.; GAUTAM, O .P.; KHAROLE, M.U. Studies on some aspects of pathogenesis, chemotherapy and serology of experimental toxoplasmosis in dogs. **Indian.Vet.J.**, v. 50, n. 7, p. 623-626, 1973.

SLAPPENDEL, R.J., FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. (ed). **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia, p. 450-458, 1998.

SOFRONIEW, M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Neurosciences**, v.32, n.12, p. 638-647, 2009.

SONG, J.H., BELLAIL, A., TSE, M.C.L., YONG, V.W., HAO, C. Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. **J. Neurosci.** v. 26, p. 3299-3308, 2006.

STAMATOVIC, S.M., KEEP, R. F., ANDJELKOVIC, A.V. Brain endothelial cell-cell junctions: how to open the blood brain barrier. **Current Neuropharmacology**, v. 6, p. 179-192, 2008.

STRAZIELLE, N.; GHERSI-EGEA, J.F. Choroid plexus in the central nervous system: biology and pathophysiology. **J Neuropathol Exp Neurol.** V.59, n.7, p.561-74, 2000.

SUTER, M. et al. Polymyositis-Polyradiculitis Due to Toxoplasmosis in the dog: Serology and Tissue Biopsy as Diagnostic Aids. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v. 31, n. 10, p. 792-798, 1984.

SUZUKI, Y; RAMINGTON, JS Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection. **J. Immunol.**, v.140, p.3943-3946, 1988.

TAMBUYZER, B.R., PONSAERTS, P., NOUWEN, E. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 85, p.360-365, 2009.

TARANTINO, C.; ROSSI, G.; KRAMER, L.H.; PERUCCI, S.; CRINGOLI, G.; MACCHIONI, G. *Leishmania infantum* and *Neospora caninum* simultaneous skin infection in a young dog in Italy. **Vet Parasitol**. v.102, p.77-83, 2001.

THOMPSON, E.J., KEIR, G. Laboratory investigation os cerebrospinal fluid proteins. **Ann Clin Biochem**, v.27, p.425-435, 1990.

TORRES-NETO, R.; RODRIGUES, M.M.P.; AMORIM, R.L.; CONCEIÇÃO, L.G.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FRANCO, S.R.V.S. Expression of CD3 and CD79a cell markers in exfoliative and ulcerative skin lesion in dogs with leishmaniasis. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.165-174, 2008.

TRIPATHI, A.K., SULLIVAN, D.J., STINS, M.F. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium trough NF-kappaB. **Infect Immun**. v. 74, p.3262-3270, 2006.

TRIPATHI, A.K., SULLIVAN, D.J., STINS, M.F. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes decrease the integrity of human blood-brain barrier endothelial cell monolayers. **J Infect Dis**, v.195, p.942-950, 2007.

VARANDAS, N.P.; RACHED, P.A.; COSTA, G.H.N.; SOUZA, L.M.; CASTAGNOLLI, K.C.; COSTA, A.J. Freqüência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em cães da região nordeste do Estado de São Paulo. Correlação com neuropatias. **Semina: Ci. Agrárias**, v.22, n.1, p.105-111, 2001.

VIÑUELAS, J., GARCIA-ALONSO, M., FERRANDO, L. *et al.* Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Vet Parasitol.**, v.101, p.23-27, 2001.

WEBB A.A; MUIR G.D. The blood-brain barrier and its role in inflammation. **J Vet Intern Med.** v.14, n.4, p.399-411, 2000.

WEBB, J.A.; KELLER, S.L.; SOUTHORN, E.P.; ARMSTRONG, J.; ALLEN, D.G.; PEREGRINE, A.S.; DUBEY, J.P. Cutaneous Manifestations of Disseminated Toxoplasmosis in an Immunosuppressed Dog. **J Am Anim Hosp Assoc.**, v.41, p.198-202, 2005.

WEKERLE, H., LINNINGTON, H., LASSMANN, H., MEYERMANN, R. Cellular immune reactivity within the CNS. **Trends Neurosci.** v.9, p.271-277, 1986.

WELLER, R.O., ENGELHARDT, B., AND PHILLIPS, M.J. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. **Brain Pathol.** 6:275-288, 1996.

WILLIAMS, K.C., AND HICKEY, W.F. Traffic of hematogenous cells through the central nervous system. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v.202, p.221-245, 1995.

XAVIER, S.C.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L. Canine visceral Leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal repostia from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.994-1000, 2006.

YLMAZ, M.S.; HOPKINS, S.H. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.58, n.5, p. 938-939, 1972.

YONG, V.W.; KREKOSKI, C.A.; FORSYTH, P.A.; BELL, R.; EDWARDS, D.R.
Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. **TINS**. v.21, p.75-80, 1998.

Apêndice A. Identificação, resultados individuais do exame necroscópico e sorológico, e classificação dos cães utilizados no experimento.

CÃO	SEXO	RAÇA	IDADE	LEISHMANIA	TOXOPLASMA	NEOSPORA	GRUPO
10	Macho	Poodle	Adulto Jovem	Positivo	1:640	1:100	Grupo 1
11	Macho	Pit Bull	Jovem	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
12	Fêmea	Pit Bull	Jovem	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
13	Macho	SRD	Adulto Jovem	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
14	Fêmea	Rottweiler	Jovem	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
15	Fêmea	Cocker	Adulto	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
16	Macho	Teckel	Adulto Jovem	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
17	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
18	Fêmea	Teckel	Jovem	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
19	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	1:1200	Negativo	Grupo 1
20	Fêmea	Pequinês	Adulto	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
21	Fêmea	Poodle	Adulto	Positivo	1:5120	Negativo	Grupo 1
22	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	1:640	1:200	Grupo 1
25	Macho	Teckel	Adulto Jovem	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
27	Macho	SRD	Adulto	Negativo	Negativo	Negativo	Grupo 3
29	Fêmea	SRD	Adulto Jovem	Positivo	1:640	1:200	Grupo 1
31	Macho	SRD	Adulto	Negativo	Negativo	Negativo	Grupo 3
32	fêmea	SRD	Jovem	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
34	Macho	SRD	Adulto	Positivo	1:2560	1:200	Grupo 1
38	Fêmea	Pit Bull	Jovem	Negativo	1:50	Negativo	Grupo 3
39	fêmea	SRD	Adulto	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
41	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	1:40	1:6400	Grupo 1
42	Fêmea	SRD	Jovem	Negativo	Negativo	Negativo	Grupo 3
43	Macho	SRD	Adulto	Positivo	1:1280	1:100	Grupo 1
46	Macho	Pit Bull	Adulto	Positivo	Negativo	1:40	Grupo 2
47	Macho	Pit Bull	Jovem	Positivo	Negativo	1:25	Grupo 2
48	Macho	Rottweiler	Senil	Negativo	1:40	1:50	Grupo 3
49	Macho	Pit Bull	Adulto	Positivo	1:80	1: 24600	Grupo 1
58	Macho	SRD	Adulto	Negativo	1:40	1:25	Grupo 3
61	Macho	SRD	Adulto jovem	Positivo	1:80	1:400	Grupo 1
62	Fêmea	SRD	Adulto Jovem	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
64	Fêmea	Pisncher	Adulto	Positivo	Negativo	1:25	Grupo 2
65	Fêmea	SRD	Adulto jovem	Negativo	Negativo	Negativo	Grupo 3
66	Macho	SRD	Adulto jovem	Negativo	Negativo	Negativo	Grupo 3
67	Macho	Pit Bull	Adulto	Positivo	Negativo	1:800	Grupo 1
70	Macho	SRD	Adulto	Positivo	1:40	1:800	Grupo 1
71	Macho	SRD	Adulto	Negativo	Negativo	Negativo	Grupo 3
77	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	1:2800	1:2800	Grupo 1
79	Macho	SRD	Adulto	Positivo	1:40	1:800	Grupo 1
80	Macho	SRD	Jovem	Positivo	1:320	Negativo	Grupo 1
81	Macho	Poodle	Adulto	Positivo	1:320	Negativo	Grupo 1
83	Macho	Poodle	Jovem	Positivo	1:320	1:800	Grupo 1
84	Macho	SRD	Adulto	Positivo	1:40	1:800	Grupo 1
85	Macho	SRD	Adulto	Positivo	1:40	1:400	Grupo 1

86	Macho	SRD	Adulto	Positivo	1:320	1:800	Grupo 1
89	Macho	SRD	Adulto	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
91	Macho	SRD	Adulto	Positivo	Negativo	Negativo	Grupo 2
92	Macho	SRD	Adulto	Negativo	Negativo	Negativo	Grupo 3
93	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	1:160	1:800	Grupo 1
94	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	1:640	1:800	Grupo 1
95	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	1:40	1:800	Grupo 1
96	Macho	SRD	Adulto	Positivo	1:40	1:1600	Grupo 1

Apêndice B. Representação esquemática da metodologia utilizada para quantificação das células inflamatórias no encéfalo dos cães, a partir dos cortes corados pela imunohistoquímica.

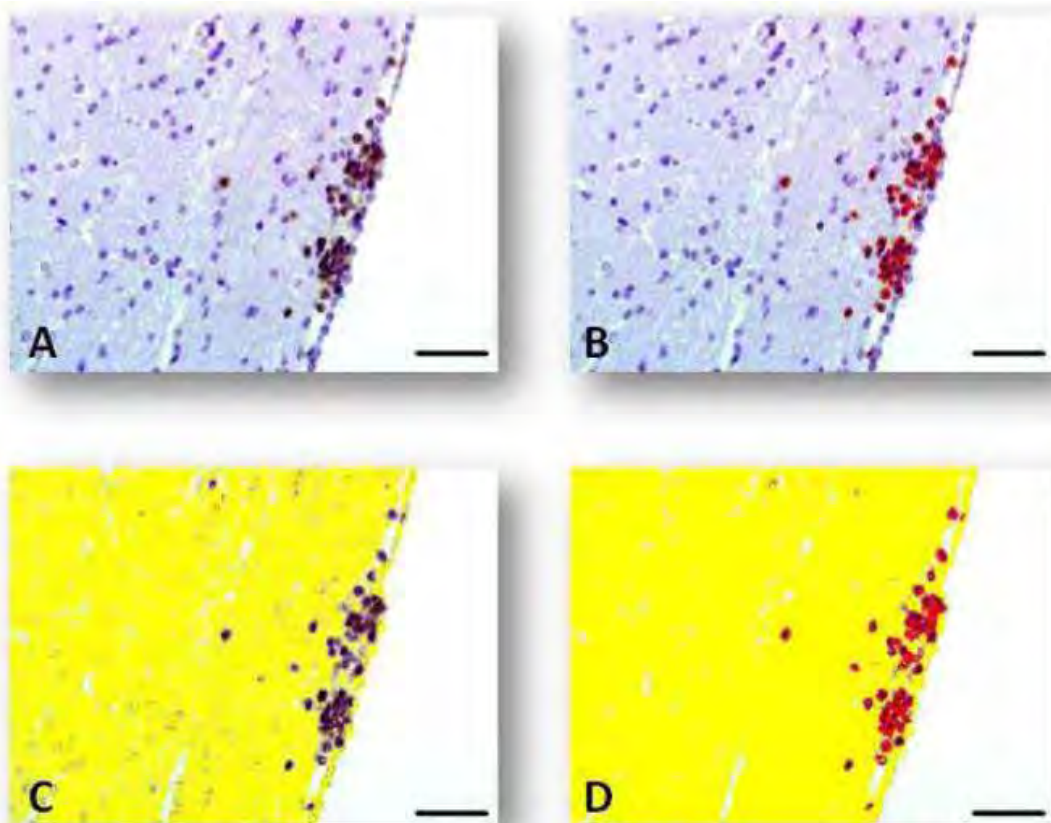


Figura B1. Representação esquemática do método utilizado para avaliação dos cortes corados pela imunohistoquímica, por meio do *software* Image-Pro Plus 6.1. **A-** Fotomicrografia do campo microscópico selecionado para análise, evidenciando linfócitos T CD3⁺ imunomarcados (células em castanho) em região sub-ependimária. **B-** Seleção da área imunomarcada. **C-** Seleção da área de fundo, relativa ao parênquima nervoso. **D-** Cálculo da relação das áreas imunomarcada (em vermelho) e total (em amarelo). Essa metodologia permite descontar artefatos de técnica ou áreas da lâmina sem a presença de tecido, uma vez que a avaliação é realizada nas extremidades de regiões encefálicas que apresentam superfície irregular e circunvoluções (barra = 50 μ m).